



**Korrelative licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zu  
Tonoplast intrinsischen Proteinen als Merkmale  
verschiedener Vakuolentypen**

Andrea Olbrich

Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Andrea Olbrich  
aus Papenburg

Tag der mündlichen Prüfung:

Korrelative licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zu  
Tonoplast intrinsischen Proteinen als Merkmale  
verschiedener Vakuolentypen

Gutachter: Prof. Dr. David G. Robinson  
Prof. Dr. Thomas Rausch

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
2.1 Die Vakuole .....	5
2.1.1 Entstehung von Vakuolen .....	7
2.1.2 Proteintransport zu den Vakuolen.....	8
2.2 Der Tonoplast.....	10
2.2.1 Tonoplast intrinsisches Protein (TIP) .....	10
2.2.1.1 Struktur.....	11
2.2.1.2 Funktion .....	12
2.2.1.3 Gewebe- und Entwicklungsstandspezifische Lokalisation .....	14
2.2.2 Die V-ATPase als Kontrollmarker.....	16
2.2.2.1 Struktur und Funktion .....	17
2.3 Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1 Versuchsobjekte und Anzuchtbedingungen.....	19
3.2 Antikörper .....	20
3.2.1 Primär-Antikörper .....	20
3.2.2 Sekundär-Antikörper.....	21
3.3 Lichtmikroskopie .....	21
3.3.1 Fixierung, Entwässerung und Einbettung .....	21
3.3.2 Mikrotomie.....	23
3.3.3 Entwachsen der Schnitte .....	24
3.3.4 Immunofluoreszenz-Markierung.....	24
3.3.5 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop .....	26
3.4 Elektronenmikroskopie .....	26
3.4.1 Strukturfixierung der Erbsen- und Gerstenwurzelspitzen.....	26
3.4.2 Fixierung der Erbsen- und Gerstenwurzelspitzen für die Immunogoldmarkierung.....	28
3.4.3 Präparation der Trägernetzen (Grids).....	31
3.4.4 Ultramikrotomie.....	31
3.4.5 Einfache Immunogoldmarkierung .....	32
3.4.6 Doppelte Immunogoldmarkierung.....	33
3.4.7 Nachkontrastierung der Spurr-Ultradünnschnitte .....	35
3.4.8 Nachkontrastierung der Lowicyl-Ultradünnschnitte.....	35
3.5 Proteinbiochemie .....	36
3.5.1 Isolierung der Membranfraktionen aus Gersten- und Erbsenwurzeln ....	36
3.5.2 Isolierung von Proteinkörpern (Proteinbodies) aus Erbsenkotyledonen.	37
3.5.3 Isolierung der Membranfraktion aus Gerstenblättern .....	38
3.5.4 Entfernung der peripheren Membranproteine.....	39
3.5.5 Proteinbestimmung nach Lowry .....	39
3.5.6 Chloroform/Methanol-Fällung.....	41
3.6 Elektrophoretische Methoden .....	41
3.6.1 Probenvorbereitung.....	42
3.6.2 Molekularmassen-Marker .....	42
3.6.3 Herstellung der diskontinuierlichen Gele .....	43

3.6.4	Herstellung der Gradienten-Gele .....	44
3.6.5	Gelelektrophorese .....	45
3.6.6	Western-Blotting .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1	Versuchsobjekte .....	48
4.2	Strukturelle Untersuchung der Erbsenkeimwurzeln .....	49
4.3	Lokalisierung der Proteinspeichervakuolen .....	51
4.4	$\alpha$ -TIP-Lokalisierung .....	54
4.5	$\gamma$ -TIP-Lokalisierung .....	57
4.6	$\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Immunogoldmarkierung .....	60
4.7	Western-Blot .....	64
4.8	V-ATPase-Lokalisierung .....	65
4.9	Wurzelspitzen der zehn Tage alten Gersten und Erbsen .....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
5.1	Vakuolenbiogenese in der Erbsenkeimwurzelkalyptra .....	70
5.2	Ist $\alpha$ -TIP ein Markerprotein für Proteinspeichervakuolen? .....	72
5.3	Ist $\gamma$ -TIP ein Markerprotein für lytische Vakuolen? .....	73
5.4	$\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Lokalisierung im Vergleich .....	76
5.5	Gibt es auch in Wurzeln von älteren Pflanzen Proteinspeichervakuolen? .....	81
5.6	Welche Funktion haben Speicherproteine in Wurzelspitzen? .....	82
5.7	Ausblicke .....	84
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
AFS	„automatic freeze substitution system“
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.
BiP	„immunoglobulin binding protein“
BP-80	Bindungsprotein von 80 kDa
BSA	Rinderserumalbumin
CCV	„Clathrin coated vesicle“
CR	cytoplasmatische Region
C-terminal	<i>carboxy</i> -terminal
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
DV	„dense vesicle“
E64	<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanido)-Butan
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EGTA	1,2-bis-(2-Aminoethoxy-Ethan)-N,N,N,N-Tetraessigsäure
ELP	„epidermal growth factor like protein“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
GFP	„green fluorescent protein“
$g_{\max}$	Maximale Erdbeschleunigung
IgG	Immunglobuline
KTC	Kupfer-Tartrat-Karbonat-Reagenz
LR-White	London Resin White
MES	4-Morpholinethansulfonsäure
MIP	„major intrinsic protein“
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
MVB	„multivesicular body“
NIP	Synonym für NLP, „NOD 26-like MIP“
NLP	„NOD 26-like MIP“
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAC-Vesikel	„precursor-accumulating vesicle“

PB	„proteinbody“
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PIP	„plasma membrane intrinsic protein“
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure); $C_8H_{18}N_2O_6S_2$
PSV	Proteinspeichervakuole
PVC	„prevacuolar compartment“
PLT	„progressive lowering of temperature technique“
Rs	<i>Raphanus sativus</i> L.
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIP	„small basic intrinsic proteins“
So	<i>Spinacia oleracea</i> L.
Sun	<i>Helianthus annuus</i> L.
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TIP	„tonoplast intrinsic protein“
TM	„transmembrane domain“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
ü. N.	über Nacht
V	Volt
$v/v$	Volumen pro Volumen
VSP	vegetatives Speicherprotein
W	Watt
$w/v$	Gewicht pro Volumen
$w/w$	Gewicht pro Gewicht
WGA	„wheat germ agglutinin“, Weizenkeimlektin
Zm	<i>Zea mays</i> L.

## 1 Zusammenfassung

Die pflanzliche Vakuole ist ein multifunktionales Organell, das von zentraler Bedeutung für die Morphologie und Physiologie der einzelnen Zellen und der gesamten Pflanze ist (Surpin und Raikhel, 2004). Aufgrund des hydrolytischen Milieus in ihrem Innern wird sie häufig mit dem Lysosom tierischer Zellen verglichen (Boller und Kende, 1979). Ihre Funktionen sind jedoch wesentlich vielseitiger. Hinzu kommt, dass in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, dass eine pflanzliche Zelle zwei funktionell verschiedene Vakuolen aufweisen kann: die lytische Vakuole und die Proteinspeichervakuole (Holwerda et al., 1990; Holwerda und Rogers, 1992; Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996; Fleurat-Lessard et al., 1997; Swanson et al., 1998). Eine solche Differenzierung, die zwei alternative sekretorische Wege zu den jeweiligen Vakuolen erfordert, wurde bisher weder für das Lysosom tierischer Zellen noch für die Vakuole der Hefe beschrieben.

Die zwei verschiedenen Vakuolentypen pflanzlicher Zellen konnten dabei nicht nur aufgrund ihres Inhalts und dessen pH-Wert unterschieden werden, sondern auch anhand verschiedener Isoformen der in ihren Tonoplasten enthaltenen Aquaporine, den „tonoplast intrinsic proteins“ (TIPs). Dabei wird  $\alpha$ -TIP im Tonoplast als Merkmal für Proteinspeichervakuolen und  $\gamma$ -TIP als Merkmal für den Tonoplast lytischer Vakuolen angesehen (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996).

Ausgehend von dieser Hypothese wurden die Wurzelspitzen von Keimlingen und zehn Tage alten Gersten- und Erbsenpflanzen zunächst ultrastrukturell und dann durch Immunmarkierungen untersucht. Hierfür wurden intakte Wurzelspitzen verwendet, sodass der Entwicklungsstand der Zellen, und damit ebenfalls ihrer Vakuolen, aufgrund ihrer Lage innerhalb der Wurzeln abgelesen werden konnte. Durch die Immunfluoreszenz-Markierungen wurde die generelle Verteilung der jeweiligen Proteine innerhalb der Wurzeln ermittelt, während die Immunogold-Markierung bei wesentlich höherer Auflösung der genauen Lokalisation innerhalb der Zellen diente. Diese korrelative Studie ermöglichte somit eine sehr differenzierte Auswertung bei optimaler Auflösung.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass in Wurzeln von Gerstenkeimlingen und zehn Tage alten Gerstenpflanzen Gerstenlektin gespeichert wird. Bei den Erbsen hingegen wird nur in den Wurzeln von Keimlingen Vicilin gebildet, während in den Wurzeln der zehn Tage alten Erbsenpflanzen Vicilin nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dabei konnte eine generelle Korrelation zwischen dem Vorkommen von dem als Markerprotein für



den Tonoplast von Proteinspeichervakuolen angesehenen  $\alpha$ -TIP und den Speicherproteinen in einem Gewebe bestätigt werden. Innerhalb der Wurzeln stellte sich jedoch heraus, dass die Bereiche, in denen  $\alpha$ -TIP vorkommt, nicht vollständig übereinstimmen mit den Bereichen, in denen die Speicherproteine nachgewiesen wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine gleichzeitige Immunogold-Markierung von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP an Schnitten von Gersten- und Erbsenkeimwurzeln angefertigt. Das Ergebnis dieser Markierung ist, dass in den Wurzelspitzen von Gersten- und Erbsenkeimlingen keine Vakuolen identifiziert werden konnten, die ausschließlich  $\gamma$ -TIP in ihrem Tonoplast enthalten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von den von Paris und Mitarbeitern (1996) durchgeführten Immunofluoreszenz-Markierungen von Gersten- und Erbsenkeimwurzel-Quetschpräparaten. Diese führten zu der Theorie, dass in den Gersten- und Erbsenkeimwurzeln zunächst zwei unterschiedliche Vakuolen entstehen, die im Zuge der Entwicklung miteinander verschmelzen. Stattdessen deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass die Vakuolen in den meristematischen Keimwurzelzellen durch autophagische Membranstrukturen entstehen, die zunächst ausschließlich  $\alpha$ -TIP enthalten. Im Zuge der Entwicklung wird zusätzlich zum  $\alpha$ -TIP auch  $\gamma$ -TIP in die Tonoplasten der daraus entstehenden Vakuolen integriert. Da in diesen Vakuolen Speicherproteine nachgewiesen werden können, handelt es sich um Proteinspeichervakuolen.

Für das als Markerprotein für lytische Vakuolen angesehene Aquaporin  $\gamma$ -TIP konnte somit überraschenderweise sehr deutlich gezeigt werden, dass es im Tonoplast von Proteinspeichervakuolen vorkommt. Zusätzlich konnte - entgegen den Erwartungen - in den Tonoplasten der Vakuolen des sich ausbildenden Zentralzylinders, die keine Speicherproteine enthalten und somit lytische Vakuolen darstellen sollten,  $\gamma$ -TIP nicht nachgewiesen werden.  $\gamma$ -TIP kann deshalb in den Wurzelspitzen nicht als Markerprotein für den Tonoplast lytischer Vakuolen eingesetzt werden.

Die vorliegenden Daten zeigen somit deutlich, dass zumindest in Wurzelgeweben von der Verwendung der TIP-Isoformen als Merkmal zur Identifikation von verschiedenen Vakuolentypen abgesehen werden sollte und stellt generell in Frage, ob Aquaporine als Marker fungieren können. Um neben den Inhaltsstoffen zuverlässige Merkmale für die einzelnen Vakuolentypen zu finden, wäre es deshalb empfehlenswert in Zukunft nach vakuolären Membranproteinen zu suchen, die an Schlüsselfunktionen der sekretorischen Sortierungsmaschinerie beteiligt sind.

## Summary

The plant vacuole is often considered to be a multifunctional organelle which plays a key role in the morphology and physiology of a single cell and is therefore of great importance for the entire plant (Surpin and Raikhel, 2004). Because of its hydrolytic content it is often compared with the lysosome of animal cells (Boller and Kende, 1979). However, its functions are much more diverse. It has now been shown that a single plant cell can harbour two functionally different vacuoles: the lytic vacuole and the protein storage vacuole (Holwerda et al., 1990; Holwerda and Rogers, 1992; Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996; Fleurat-Lessard et al., 1997; Swanson et al., 1998;). Such a differentiation, which then requires two different secretory pathways, has not been shown either for the lysosome of animal cells or for the yeast vacuole.

The different types of vacuoles can be distinguished not only by their contents and pH, but also by different isoforms of tonoplast aquaporins, so called tonoplast intrinsic proteins (TIPs). Currently,  $\alpha$ -TIP is regarded as marker for protein storage vacuoles and  $\gamma$ -TIP as marker for lytic vacuoles (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996).

In order to determine how these vacuole types originate and differentiate, the root tips of seedlings and of 10 day old plants of barley and pea were investigated ultrastructurally and by immuno-labelling. Intact root tips were used, so that the developmental stage of the cells and also of their vacuoles could be estimated by their position within the root. By immunofluorescence-labelling the general distribution of the various marker proteins in the roots was ascertained, while the immunogold-labelling was used to investigate the precise localisation within the cells. These correlative studies allowed for a highly differentiated analysis at optimal magnifications.

I have been able to show that barley lectin is stored in the roots of barley seedlings and 10 day old plants, whereas in pea the storage globulin vicilin is synthesized only in the root tips of seedlings but could not be detected in the roots of 10 day old plants. In both plants a general correlation between the presence of  $\alpha$ -TIP and of storage proteins was confirmed. However, there were areas in the root tip where  $\alpha$ -TIP was present and in which the storage proteins could not be detected.

As a part of these studies a simultaneous immunogold-labelling of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -TIP was achieved for the first time. The most remarkable result of this labelling was that in the root tips of barley and pea seedlings no vacuoles could be identified that contained only

$\gamma$ -TIP in their tonoplast. This contradicts the results of an immunofluorescence-labelling study made by Paris and co-workers in 1996 on squash preparations of barley and pea seedling root tips. These results led to the hypothesis that in seedling roots of barley and pea two different vacuoles develop side-by-side, which later merge. Instead the data presented in the present work suggest that the vacuoles of meristematic root tip cells develop from autophagic membrane structures that initially only contain  $\alpha$ -TIP. These membrane structures develop into vacuoles which in addition to  $\alpha$ -TIP also have  $\gamma$ -TIP in their tonoplast. Since these vacuoles contain storage proteins, they must nevertheless be classified as protein storage vacuoles.

So, surprisingly, the aquaporin  $\gamma$ -TIP, which hitherto has been regarded as a marker for lytic vacuoles, can also be localized to protein storage vacuoles. In addition,  $\gamma$ -TIP could not be detected in the tonoplast of vacuoles of the developing central cylinder. These vacuoles do not contain storage proteins and should therefore be regarded as lytic vacuoles. Thus, in those root tips studied here,  $\gamma$ -TIP is not a marker for the tonoplast of lytic vacuoles.

The present data clearly show that, at least in root tips, TIP-isoforms cannot be used as tonoplast markers for different vacuolar types, and that it is questionable if the aquaporins in general can be used as markers for this purpose. To find a true marker for each vacuolar type apart from content markers, it is recommended to look for membrane proteins of the vacuoles that have a key role in the secretory sorting machinery.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Vakuole

Die pflanzliche Vakuole ist aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen von zentraler Bedeutung für die Morphologie und Physiologie der einzelnen Zellen und der gesamten Pflanze (Surpin und Raikhel, 2004). Sie füllt in den meisten pflanzlichen Zellen mehr als 90 % des Zellvolumens aus (Leidreiter et al., 1995) und ist von einer Membran, die als Tonoplast bezeichnet wird, umgeben. Da sie meist lytische Proteine in einem sauren Milieu enthält, die Proteine, Lipide und Kohlenhydrate abbauen und der Wiederverwertung zuführen, wird sie häufig mit dem Lysosom tierischer Zellen verglichen (Boller und Kende, 1979). Ihre Funktion geht jedoch über die des Lysosoms hinaus.

Die auffälligste Eigenschaft der Vakuole ist, dass über sie der Turgor reguliert wird. Dieser ist erforderlich für die Turgeszenz des Gewebes, die Elongation der Zellen in den Streckungszonen von Sproß und Wurzel und für den Schließ- und Öffnungsmechanismus der Stomata (Rojo et al., 2001). Die Vakuole dient jedoch auch der Speicherung von Zuckern, anorganischen Ionen, organischen Säuren, Sekundärmetaboliten und Abwehrstoffen (Wink, 1993). Ebenso kann sie sowohl in Samen (Müntz, 1998) als auch in vegetativen Geweben (Staswick, 1994) Proteine speichern.

Wie die sich gegenseitig ausschließenden Funktionen der Hydrolyse und der Proteinspeicherung von einem einzigen Kompartiment erfüllt werden können, war lange Zeit unklar. Es wurde jedoch angenommen, dass sich die Vakuolen der verschiedenen Gewebe entweder auf die Hydrolyse oder die Proteinspeicherung spezialisieren.

Diese Vorstellung musste revidiert werden, als in einigen Pflanzenzellen zwei voneinander getrennte, verschieden spezialisierte Vakuolentypen nachgewiesen werden konnten.

So konnte in der Aleuron-Schicht von Gerstensamen zwischen lytischen Vakuolen, die die Cystein-Protease Aleurain enthalten, und Protein speichernden Vakuolen (Proteinspeichervakuolen) differenziert werden (Holwerda et al., 1990; Holwerda und Rogers, 1992; Swanson et al., 1998). In Haarzellen von Baumwollsaamen hingegen kommen zwei morphologisch unterschiedliche Vakuolentypen vor, die während des Zellwachstums fusionieren und eine homogene Zentralvakuole bilden (Wilkins und

Tiwara, 1995). In den Motorzellen der Pulvini von *Mimosa pudica* L. wurden neben den großen Vakuolen, die eine wichtige Rolle bei der Blattbewegung spielen, kleine Tannin speichernde Vakuolen beobachtet (Fleurat-Lessard et al., 1997). Experimente mit transienten Tabak-Protoplasten führten ebenfalls zu der Theorie, dass diese Zellen neben der großen Zentralvakuole kleine Vakuolen, deren Inhalt pH-neutral ist, aufweisen, die zum Teil später mit der Zentralvakuole fusionieren (Di Sansebastiano et al., 1998; Di Sansebastiano et al., 2001). Auch in den Mesophyllzellen der CAM-Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* L. wurden unter Salzstress zwei Vakuolentypen mit unterschiedlichem pH-Wert im Innern beobachtet (Epimashko et al., 2004). In den Zellen, der sich entwickelnden Erbsenkotyledonen und der Erbsen- und Gerstenkeimwurzelspitzen, wurden ebenfalls gleichzeitig vorkommende Proteinspeichervakuolen und lytische Vakuolen nachgewiesen (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996). In diesen Geweben wurden die Vakuolen jedoch nicht nur aufgrund ihres Inhaltes, sondern auch aufgrund von spezifischen Isoformen, der in großen Mengen im Tonoplast vorkommenden Membranproteinen, den "tonoplast intrinsic proteins" (TIPs) unterschieden. Dabei wurde  $\alpha$ -TIP, das aus Proteinspeichervakuolen von Samengewebe bekannt war, auch in diesen Zellen im Tonoplast der Proteinspeichervakuolen nachgewiesen. Das in Geweben mit großen lytischen Vakuolen identifizierte  $\gamma$ -TIP hingegen, wurde in der Membran der lytischen Vakuolen lokalisiert (Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996). Dies führte zu der Hypothese, dass  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP als Markerproteine für bestimmte Vakuolentypen dienen können. Da Jauh und Mitarbeiter  $\delta$ -TIP in verschiedenen vegetativen Geweben, wie Blütenblättern und Wurzelspitzen, in denen Pigmente oder Proteine gespeichert werden, nachwiesen und erweiterten sie diese Hypothese. Danach kann eine einzelne Zelle sogar drei verschiedene Vakuolentypen enthalten, die entweder  $\alpha$ -,  $\delta$ - oder  $\gamma$ -TIP im Tonoplast aufweisen (1999). Nach ihrer Hypothese ist  $\delta$ -TIP ein Merkmal von Proteinspeichervakuolen in vegetativen Geweben. Dem widerspricht jedoch, dass  $\delta$ -TIP in den Proteinbodies der Erbsenkotyledonen und nicht in den Gerstenwurzelspitzen nachgewiesen werden kann (Olbrich, 2000).

### 2.1.1 Entstehung von Vakuolen

In Testa-Zellen von Leinsamen und in Tannin-produzierenden Zellen von *Oenothera odorata* L. wurden Bereiche von glattem Endoplasmatischem Retikulum (ER) beschrieben, die zum Teil in Verbindung stehen mit rauhem ER und netzartige Strukturen ausbilden, die cytoplasmatische, organellenfreie Regionen umschließen (Amelunxen und Heinze, 1984; Hilling und Amelunxen, 1985). Nach der Theorie von Amelunxen und Mitarbeitern entstehen die Vakuolen indem das Cytoplasma, das von den vom ER stammenden Membranen vollkommen eingeschlossen wird, zusammen mit der inneren Membran abgebaut wird.

Marty und Mitarbeiter (1997) beschrieben ebenfalls, dass die Vakuolen in meristematischen Wurzelgeweben durch Autophagie entstehen. Im Gegensatz zu Amelunxen und Mitarbeitern postulierten sie hingegen, dass die Vakuolen aus Vesikeln entstehen, die vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) abgeschnürt werden und ein tubuläres, provakuoläres Netzwerk ausbilden. Dieses umschließt eine cytoplasmatische Region, die abgebaut wird. Der Golgi-Ursprung des Netzwerkes, der unter anderem damit begründet wird, dass dieses, wie das TGN, aktive saure Hydrolasen beinhaltet (Marty, 1978), ist jedoch umstritten. Es ist auch denkbar, dass das primäre Netzwerk vom ER gebildet wird und die von Marty und Mitarbeitern nachgewiesenen TGN-Enzyme sekundär durch die beobachteten Vesikel vom Golgi-Apparat zum Netzwerk transportiert werden (Robinson und Hinz, 1997).

Dass auch die Proteinspeichervakuolen in den sich entwickelnden Erbsenkotyledonen durch Autophagie entstehen, konnte von Hoh und Mitarbeitern gezeigt werden (1995). In den sehr jungen, 4-5 mm großen Kotyledonen sind zunächst viele kleine lytische Vakuolen vorhanden, die dann in den 8 mm großen Keimblättern von einem neu entstehenden tubulären Membransystem umringt werden, das Speicherproteine enthält. Da im Lumen dieser Ringe das ER-residente „immunoglobulin **binding** protein“ (BiP) lokalisiert werden konnte, wird vermutet, dass dieses Membransystem aus dem ER entsteht (Robinson et al., 1995). Während der Entwicklung der Erbsenkotyledonen erweitert sich diese Ringstruktur und die eingeschlossenen vegetativen Vakuolen bilden sich zurück (Hoh et al., 1995). Diese Beobachtungen zeigten erstmalig, dass die Proteinspeichervakuolen in Erbsenkotyledonen neu gebildet werden, und dass nicht, wie zuvor angenommen, Teile der vegetativen Vakuole durch Proteineinlagerungen in eine Proteinspeichervakuole umfunktioniert werden (Craig et al., 1979; Craig et al., 1980).

### 2.1.2 Proteintransport zu den Vakuolen

Die meisten vakuolären Proteine werden über das sekretorische System in die Vakuolen transportiert. Dabei müssen diese Proteine in Zellen, die zwei verschiedene Vakuolentypen enthalten, gezielt in die jeweilige Vakuole transportiert werden können.

Der Transport sekretorischer Proteine mit einer Molekularmasse über 8 kDa in das ER ist mit ihrer Translation gekoppelt und wird deshalb Co-translational bezeichnet (Rapoport et al., 1996). In sich entwickelnden Kürbiskotyledonen wurden Vesikel beobachtet, die die Speicherproteine direkt vom ER zu den Proteinspeichervakuolen transportieren. Diese wurden „**precursor-accumulating vesicles**“ (PAC-Vesikel) genannt (Hara-Nishimura et al., 1998).

Die meisten Speicherproteine passieren jedoch, ebenso wie die für die lytischen Vakuolen bestimmten Proteine, den Golgi-Apparat. Hier erfolgt die Sortierung zu den verschiedenen Vakuolen (Robinson und Hinz, 1999).

Die lytischen Proteine werden mit Hilfe von vakuolären sortierungs **Rezeptoren** (VSRs), wie z.B. dem BP-80 (**B**indungs**p**rotein von **80** kDa) aus *Pisum sativum* L. und dem hierzu homologen *Arabidopsis thaliana* ELP („epidermal growth factor **l**ike **p**rotein“, in „Clathrin coated vesicles“ (CCVs) sortiert (Paris et al., 1997; Paris und Neuhaus, 2002; Ahmed et al., 2000). Diese fusionieren nach der Dissoziation der Clathrin-Proteinhülle mit dem prävakuolären Kompartiment („**pre**vacuolar **c**ompartment“ - PVC). In *Nicotiana tabacum* BY-2-Zellkultur-Zellen konnte erstmals ein Kompartiment als PVC identifiziert werden, das innerhalb der umgebenen Membran viele vesikuläre Strukturen aufweist und deshalb als „**m**ultivesicular **b**odies“ (MVB) bezeichnet wird (Tse et al., 2004). In diesen Zellen liegen somit die MVBs auf dem Weg zur lytischen Vakuole.

Die Speicherproteine der Erbsenkotyledonen werden hingegen in Vesikeln transportiert, die 130 - 150 nm groß und nicht mit Clathrin umhüllt sind (Hohl et al., 1996). Da ihr Inhalt aus elektronendichtem, aggregiertem Speicherprotein besteht und somit im Elektronenmikroskop dunkel erscheint, werden diese Vesikel als "**d**ense **v**esicles" (DVs) bezeichnet (Hohl et al., 1996). In seltenen Fällen konnten auch Clathrin-umhüllte Membranausstülpungen an den DVs gesehen werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um CCVs, die die für die lytische Vakuole bestimmten Proteine aus den CVs heraussortieren (Robinson und Hinz, 1999).

Auffällig ist, dass die DVs, im Gegensatz zu den CCVs, die ausschließlich vom *trans*-Bereich des Golgi-Apparates gebildet werden, an allen Zisternen zu beobachten sind. Die DVs des *cis*-Bereichs sind jedoch weniger elektronendicht als die des *trans*-Bereichs (Robinson et al., 1998). Untersuchungen der Speicherprotein-Verteilung im Golgi-Apparat und in den DVs haben gezeigt, dass die Legumine, die nicht im Golgi-Apparat modifiziert werden, im *cis*-Bereich in die DVs sortiert werden und in den Zisternen des *trans*-Bereichs kaum noch vertreten sind. Die Vicilinkonzentration in den Zisternen nimmt ebenfalls vom *cis*- zum *trans*-Bereich ab, jedoch mit flacherem Gradienten. Dies wird darauf zurückgeführt, dass einzelne Viciline komplex glykosyliert werden und deshalb erst nach Abschluss der Modifizierungen den Golgi-Apparat verlassen (Hillmer et al., 2001). Die DVs scheinen während dieser Sortierung einen Reifungsprozess zu durchlaufen, der an die Zisternen-Progression gekoppelt ist (Robinson et al., 1998).

Die Membran der DVs enthält das Membranprotein  $\alpha$ -TIP, jedoch nicht den Sortierungsrezeptor für lytische Proteine BP-80 (Hinz et al., 1999). Für die Sortierung der Speicherproteine in die DVs wurde postuliert, dass dieser Vorgang nicht, oder nur die Initiierung, über Rezeptorproteine vermittelt wird und stattdessen die Proteinaggregation der entscheidende Schritt für die Entstehung der DVs ist (Hinz et al., 1999). Nach der Theorie von Thiele und Mitarbeitern (1997) wird dabei die Selbstaggregation der Proteine durch die Brückenfunktion hydrophober Proproteine, die sich an die Membran anlagern, initiiert. Für das Erbsen- und Linsenlektin konnte gezeigt werden, dass es sich an Membranen anlagert und mit anderen Speicherproteinen interagiert (Freier und Rüdiger, 1987; Kummer und Rüdiger, 1988). Deshalb wurde diesen Lektinen eine für die Proteineinlagerung wichtige Brückenfunktion zwischen den Membranen und den Speicherproteinaggregaten zugeschrieben (Wenzel et al., 1993). Die Aggregation der Speicherproteine erfolgt jedoch zumindest bei den Conglutinen von *Lupinus albus* L. nicht vermittelt durch Lektin, sondern ist Calcium/Magnesium-abhängig und damit elektrostatischer Natur (Ferreira et al., 2003).

Als prävakuoläres Zielkompartiment der DVs wurden in Erbsenkotyledonen ebenfalls multivesikuläre Kompartimente beschrieben, die auch als MVB bezeichnet werden (Robinson und Hinz, 1999). Die Membranen dieser MVBs enthalten kein BP-80, aber  $\alpha$ -TIP. Die Untersuchung der Vicilin- und Legumin-Verteilung, deren Expression zeitlich versetzt beginnt, in den Erbsenkotyledonen zeigte, dass die MVBs mit den Proteinspeichervakuolen verschmelzen (Robinson et al., 2000).



In den schon reiferen Samen werden - von den mit Speicherproteinaggregaten angereicherten Proteinspeichervakuolen ausgehend - zwei weitere Typen von Proteinspeichernden Strukturen gebildet: Erstens die runden, uniform mit Proteinen ausgefüllten Proteinkörper ("**proteinbodies**", PBs) und zweitens ein weit verzweigtes Netz von Zisternen, das ebenfalls gleichförmig mit Proteinen gefüllt ist und mit den Proteinspeichervakuolen in Verbindung steht (Craig et al., 1979 und 1980; Craig, 1986; Robinson und Hinz, 1997). Die Proteinspeichervakuolen und die aus diesen entstehenden Strukturen enthalten  $\alpha$ - und  $\delta$ -TIP (Hoh et al., 1995; Olbrich, 2000).

## 2.2 Der Tonoplast

Die Membran, die die Vakuole umgibt, heißt Tonoplast. Die häufigsten Membranproteine des Tonoplasten sind die Aquaporine, die „**tonoplast intrinsic proteins**“ (TIPs) genannt werden. Ihr Anteil am gesamten Tonoplastenprotein beträgt z. B. im Hypokotyl der Mungo-Bohnen 40 %, während die vakuoläre  $H^+$ -ATPase und Pyrophosphatase 15 und 10 % des Proteins stellen (Maeshima et al., 1989; Matsuura-Endo et al., 1990; Maeshima 2001).

### 2.2.1 Tonoplast intrinsisches Protein (TIP)

Die TIPs gehören zu der hoch konservierten Membranproteinfamilie der „**major intrinsic proteins**“ (MIPs), die sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vertreten sind. Bis jetzt wurden allein im *Arabidopsis thaliana* L.-Genom 35, im Genom von *Zea mays* L. und von *Triticum aestivum* L. jeweils mindestens 31 und im Genom von *Mesembryanthemum crystallinum* bisher 14 MIP-Gene identifiziert (Tyerman et al., 1999; Chaumont et al., 2000 und 2001; Johanson et al., 2001; Maurel et al., 2002; Baiges et al., 2002). Diese können aufgrund ihrer DNA-Sequenzen in vier verschiedene phylogenetische Klassen unterteilt werden:

Die „**plasma membrane intrinsic proteins**“ (PIPs) und die TIPs bilden nicht nur wegen ihrer Sequenzhomologien jeweils eine einheitliche Gruppe, sondern auch durch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle (Maeshima, 1992; Kaldenhoff et al., 1995).

Die dritte Klasse wurde nach einem ihrer Vertreter, dem Nodulin 26, „**NOD 26-like MIP**“ (NLM) genannt. Das Nodulin 26 wird in den Wurzelknöllchen von *Glycine max* exprimiert und konnte in der peribakteroiden Membran, die die symbiotischen Bakterien umschließt, lokalisiert werden (Fortin et al., 1987; Sandal und Marcker, 1988;

Chrispeels et al., 1997). Heyman und Engel führten jedoch zur Vereinfachung der Nomenklatur die Abkürzung NIP („NOD 26-like MIP“) für diese Gruppe ein (1999).

Die Proteine der vierten Gruppe werden als „small basic intrinsic proteins“ (SIP) bezeichnet, da sie, wie die TIPs, relativ klein sind (ca. 26 kDa), sich von diesen jedoch in ihrem isoelektrischen Punkt, der wesentlich basischer ist (SIPs: pH 9,5 - 10 und TIPs: pH 4,5 - 6), unterscheiden (Johanson und Gustavsson, 2002). Ihre intrazelluläre Lokalisation ist nicht bekannt.

In verschiedensten Pflanzen konnten Gene der TIP-Familie beschrieben werden. Sie können in 5 Gruppen von enger verwandten Proteinen zusammengefasst werden:  $\gamma$ -TIP, das auch als TIP1 bezeichnet wird,  $\delta$ -TIP oder TIP2,  $\alpha$ - und  $\beta$ -TIP, die zur Gruppe der TIP3 Proteine zählen,  $\varepsilon$ -TIP oder TIP4 und  $\zeta$ -TIP oder TIP5 (Johanson und Gustavsson, 2002).

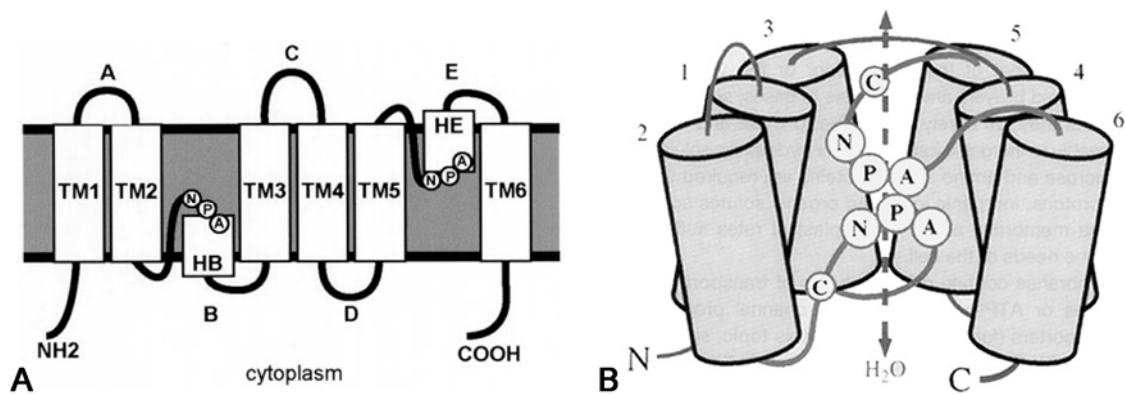
### 2.2.1.1 Struktur

Obwohl die Sequenz-Homologie der MIP-Gene teilweise 25 % unterschreiten kann, zeichnen sich die MIP-Proteine durch die gleiche dreidimensionale Struktur und hoch konservierte Regionen aus (Abbildung 1; Chaumont et al., 2001; Chrispeels et al., 1999). Die Strukturanalysen von *Phaseolus vulgaris*- $\alpha$ -TIP und dem PIP PM28A von *Pichia pastoris* haben gezeigt, dass auch die pflanzlichen MIPs die gleiche Struktur aufweisen wie das aus Säugern bekannte Erythrozyten-Aquaporin AQP1 (Daniels et al., 1999; Fotiadis et al., 2002; Karlsson et al., 2003). Die Proteine enthalten 6 integrale Membrandomänen, die die Membran durchkreuzen. Zwei der 5 Schleifen, die die Membrandomänen verbinden, tragen die stark konservierten NPA-Boxen. Für diese Schleifen wurde schon 1994 postuliert, dass diese aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften ebenfalls teilweise in die Membran eintauchen (Jung et al., 1994 b). Strukturanalysen von AQP1 haben gezeigt, dass Teile dieser Schleifen sehr kurze  $\alpha$ -Helices ausbilden, die in die Membran integriert sind (Mitsuoka et al., 1999; Chaumont et al., 2001; Engel und Stahlberg, 2002). Untersuchungen von quecksilbersensitiven TIPs zeigten, dass bestimmte Cysteinreste in der Nähe der NPA-Boxen oxidiert werden und sich an diese anlagernde Quecksilberionen die Pore versperren (Abbildung 1 B). Es wurde deshalb postuliert, dass die die NPA-Boxen tragenden Schleifen an der Ausbildung der Pore direkt beteiligt sind (Maurel, 1997). Die C- und

die N-terminale Domäne ragen sowohl bei den PIPs, als auch bei den TIPs in den cytoplasmatischen Raum.

Die C- und die N-terminale Hälfte der MIPs sind sehr homolog zueinander. Dies deutet auf eine intragenetische Duplikation hin, die sich noch vor der Divergenz von Prokaryoten und Eukaryoten vor ca. 2,5 Billionen Jahren ereignet haben muss (Reizer et al., 1993).

Da die MIPs *in vitro* Homo-Tetramere bilden, wird angenommen, dass sie dieses Verhalten auch *in vivo* zeigen (Verbavatz et al., 1993; Daniels et al., 1999; Engel et al., 2000). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass jedes Monomer eine funktionelle Einheit darstellt (van Hoek et al., 1991; Jung et al., 1994 a; Shi et al., 1994; Chrispeels et al., 1997).



**Abbildung 1: Schematische Darstellungen pflanzlicher Aquaporine**

(A) aus Chaumont et al., 2001; (B) aus Chrispeels et al., 1999

Hypothetische Struktur basierend auf topologischen Studien von pflanzlichen und tierischen MIPs. In A und B sind die konservierten Aminosäuren, der NPA-Boxen, dargestellt und in B sind zusätzlich die konservierten Cysteinreste, der quecksilbersensitiven TIPs, eingezeichnet.

TM „transmembrane domain“; A – E Schleifen, die die TMs verbinden; HB und HE Helices innerhalb der Schleifen B und E

### 2.2.1.2 Funktion

Das erste in Pflanzen beschriebene TIP war das aus Samen von *Phaseolus vulgaris* L. aufgereinigte  $\alpha$ -TIP (Johnson et al., 1989). Da dessen Aminosäuresequenz homolog ist zu der des GlpF-Membranproteins von *Escherichia coli* (Muramatsu und Mizuno, 1989; Johnson et al., 1990), von dem schon damals bekannt war, dass es für den Transport von Glycerol und anderen kleinen, nicht-ionischen Molekülen verantwortlich ist (Heller et al., 1980), wurde auch für  $\alpha$ -TIP eine Funktion beim Metabolittransport postuliert (Johnson et al., 1990). Durch die Expression von  $\alpha$ -TIP in Oozyten von *Xenopus laevis*

konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Protein die Wasseraufnahme über die Plasmamembran der Oozyten um das 4 - 8-fache erhöht und es sich dabei deshalb um ein Aquaporin handelt (Maurel et al., 1995). Sowohl durch Mutationen an potentiellen Phosphorylierungsstellen des  $\alpha$ -TIP, als auch durch Stimulation der endogenen Proteinkinase A, konnte ein klarer Zusammenhang zwischen der Wassertransportaktivität und der Phosphorylierung des  $\alpha$ -TIP aufgezeigt werden (Maurel et al., 1995). Da die  $\alpha$ -TIP-Aktivität über die Phosphorylierung gesteuert werden kann und die keimenden Samen eine Membran-gebundene Kinase, die  $\alpha$ -TIP phosphoryliert, enthalten (Johnson und Chrispeels, 1992), wurde postuliert, dass über die Phosphorylierung des  $\alpha$ -TIP das Austrocknen des reifenden und das Aufquellen des keimenden Samens reguliert werden kann (Maurel et al., 1995).

Ein über die Phosphorylierung gesteuerter Regulationsmechanismus, wie der des  $\alpha$ -TIP, konnte bei keinem weiteren TIP entdeckt werden (Johansson et al., 2000; Engel und Stahlberg, 2002). Auch bei den PIPs ist nur von einem Vertreter, dem PM28A aus *Spinacia oleracea* L., eine Regulation der Aktivität über Phosphorylierung bekannt (Johansson, 1998). Dabei ist interessant, dass für dieses Protein *in vivo* gezeigt werden konnte, dass dessen Phosphorylierung abhängig ist vom apoplastischen Wasserpotential und damit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellurgors spielen könnte (Johansson, 1996). Eine solche schnelle und flexible Reaktion auf Stressfaktoren, wie sie durch Erhöhung der Expression oder verstärkten Abbau nicht möglich ist, wurde bisher für die TIPs nicht beschrieben.

Für die meisten TIPs konnte durch Expression in Oocyten von *Xenopus laevis* gezeigt werden, dass ausschließlich Wassermoleküle, dem osmotischem Gradienten folgend, passiv durch ihre Poren diffundieren. Neben dem oben eingehend beschriebenen  $\alpha$ -TIP aus *Phaseolus vulgaris* gilt dies für: At- $\delta$ - und At- $\gamma$ -TIP aus *Arabidopsis thaliana* L. (Maurel et al., 1993; Daniels et al., 1996), Sun TIP7, 18, 20 (homolog zu At- $\delta$ -TIP) und SunRb7 (homolog zu At- $\gamma$ -TIP) aus *Helianthus annuus* L. (Sarda et al., 1997; Sarda et al., 1999),  $\delta$ - und  $\gamma$ -VM23-TIP (= RsTIP1-1 und RsTIP2-1; homolog zu At- $\delta$ -TIP, bzw. At- $\gamma$ -TIP) aus *Raphanus sativus* L. (Higuchi et al., 1998) und ZmTIP1 (homolog zu At- $\gamma$ -TIP) und ZmTIP2-3 (homolog zu At- $\delta$ -TIP) aus *Zea mays* L. (Chaumont et al., 1998; Lopez et al., 2004).

Nur das Nt-TIPa von *Nicotiana tabacum* L. ist in diesem System für Harnstoff durchlässiger als für Wasser (Gerbeau et al., 1999). Das endogene Substrat dieses transmembranen Kanalproteins ist jedoch nicht bekannt. Interessant ist allerdings, dass bei der Transformation einer Hefe-Mutante mit der cDNA von Arabidopsis Samen deren Harnstoff-Aufnahme-Deletion einzig durch TIP-Gene kompensiert wurde (Klebl et al., 2003; Liu et al., 2003). Dabei handelte es sich um zwei der drei At- $\gamma$ -TIPs, eins der drei At- $\delta$ -TIPs und das At- $\epsilon$ -TIP, die zum Teil früher aufgrund der Ergebnisse ihrer Expression in Oocyten von *Xenopus laevis* als Aquaporine mit hoher Wasserspezifität beschrieben wurden (Maurel et al., 1993; Daniels et al., 1996; Klebl et al., 2003; Liu et al., 2003).

Suga und Maeshima (2004) testeten die Aktivität von *Raphanus sativus* L. PIPs und TIPs erstmals durch Expression in *Saccharomyces cerevisiae*-Mutanten, deren endogene MIPs deletiert vorliegen. Dieses System ist besonders gut für die Untersuchung der TIPs geeignet, da TIPs hier - wie in den pflanzlichen Zellen - in der Vakuole lokalisiert sind und nicht in der Plasmamembran wie in den transgenen Oozyten. Auch in diesem System wurde die Aquaporin-Aktivität von RsTIP1-1 und RsTIP2-1 (homolog zu At- $\gamma$ -TIP und At- $\delta$ -TIP) bestätigt (Suga und Maeshima, 2004).

Es ist möglich, dass auch andere kleine, ungeladene Moleküle, wie CO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und kleine Alkohole, die Poren der MIPs passieren können (Eckert et al., 1999; Tyerman et al., 2002). Für das PIP NtAQP1 konnte durch Überexpression in vivo gezeigt werden, dass es eine physiologische Funktion als CO<sub>2</sub>-Pore einnimmt (Uehlein et al., 2003). Dies wurde jedoch bisher nicht für einen Vertreter der TIPs beschrieben.

### 2.2.1.3 Gewebe- und Entwicklungsstandspezifische Lokalisation

Die Gewebe-spezifischen Expressionsmuster und ihre Abhängigkeit von Umweltfaktoren und Hormonen wurden für einige pflanzliche MIPs in unterschiedlichsten Spezies und Geweben beschrieben. Viele dieser Arbeiten entstanden jedoch zu einem Zeitpunkt, zu dem zunächst nicht bekannt war, dass die untersuchten Proteine zu einer großen Gruppe von hoch homologen Proteinen gehören. Die ersten Antiseren gegen TIPs, die meistens auch noch in neueren Arbeiten verwendet werden, richten sich gegen die gesamten Proteine. Ebenso wurden zunächst cDNA-Sonden eingesetzt, die der

vollständigen cDNA der jeweiligen TIPs entsprechen. Hierdurch war die Spezifität der verwendeten Antiseren und cDNA-Sonden in vielen Fällen nicht sichergestellt (siehe Kap. 5.4; Maurel et al., 2002).

$\alpha$ -TIP wurde erstmals in Samen von *Phaseolus vulgaris* L. entdeckt (Johnson et al., 1989). Mit einem gegen dieses Aquaporin gerichteten Antiserum konnte in den Samengeweben verschiedenster Pflanzen, darunter Monokotyledonen, Dikotyledonen und eine Gymnosperme,  $\alpha$ -TIP nachgewiesen werden (*Glycine max*; *Hordeum vulgare*; *Nicotiana tabacum*; *Pisum sativum*; *Macrozamia* sp.; *Pinus halpensis*; *Ricinus communis*; *Triticum aestivum*; *Vigna radiata*; *Zamia pumilo*: Johnson et al., 1989; *Pisum sativum*-Kotyledonen: Hoh et al., 1995).  $\alpha$ -TIP ist jedoch nicht nur im Tonoplast der Proteinspeichervakuolen von Samen enthalten, sondern auch in Proteinspeichervakuolen des vegetativen Wurzelspitzen Gewebes von Erbsen- und Gerstenkeimlingen (siehe Kap. 2.1; *Pisum sativum*- und *Hordeum vulgare*-Wurzeln: Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999; Olbrich, 2000).

Aquaporine der  $\gamma$ -TIP-Unterklasse sind häufig verstärkt in den Meristemen und Streckungszonen nachweisbar, kommen jedoch auch in den meisten ausdifferenzierten Geweben vor, in denen die Zellen von einer zentralen Vakuole ausgefüllt werden (*Arabidopsis thaliana*: Weig et al., 1997; Phillips und Huttly, 1994; Ludevid et al., 1992; Höfte et al., 1992; *Brassica oleracea*: Barrieu et al., 1998 b; *Brassica napus*-Keimlinge: Gao et al., 1999; *Curcubita* sp.-Kotyledonen: Maeshima, 1992; *Glycine max*: Serraj et al., 1998; Maeshima et al., 1994; Miao et al., 1992; *Helianthus annuus* L.: Sarda et al., 1999; *Medicago truncatula*: Krajinski et al., 2000; *Mesembryanthemum crystallinum*: Kirch et al., 2000; *Oryza sativa*: Liu et al., 1994; *Raphanus sativus*: Maeshima, 1992; Higuchi et al., 1998; *Ricinus communis*: Langhans et al., 2001; *Zea mays*: Didierjean et al., 1996; Chaumont et al., 1998; Barrieu et al., 1998 a).

In Zellen, die zwei verschiedene Vakuolentypen beinhalten, konnte  $\gamma$ -TIP im Tonoplast der lytischen Vakuole lokalisiert werden (siehe Kap. 2.1; *Pisum sativum*-Kotyledonen: Hoh et al., 1995; *Pisum sativum*- und *Hordeum vulgare*-Wurzeln: Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999).

Es wird angenommen, dass die erhöhte  $\gamma$ -TIP-Konzentration in den Streckungszonen die verstärkte Wasseraufnahme über den Tonoplast in die Vakuolen ermöglicht, die für

die Dehnung der Zellwände und der damit verbundenen Zellexpansion nötig ist. Untersuchungen von Gerstenmutanten mit abnormem Längenwachstum bestätigten diese Hypothese, da bei diesen Pflanzen eine gesteigerte  $\gamma$ -TIP-Expression nachgewiesen werden konnte (Schünmann und Ougham, 1996). Im Gegensatz dazu konnte bei *Oryza sativa* nach Behandlung mit Gibberellinsäure und Brassinolid keine Veränderung der  $\gamma$ -TIP-Konzentration festgestellt werden (Yang et al., 2003).

Bei *Helianthus annuus* verändert sich, ausgelöst durch Wassermangel, die Expression von drei At- $\delta$ -TIP-homologen Genen in der Wurzel und in den Schließzellen grundlegend, während sich die Expression des zum At- $\gamma$ -TIP homologen SunRb7 nicht verändert (Sarda et al., 1997; Sarda et al., 1999). Es wurde deshalb postuliert, dass die  $\delta$ -TIP-Gene bei der Sonnenblume eine Schlüsselrolle bei der Bewältigung von Trockenstress einnehmen (Sarda et al., 1999).

In austrocknenden Scheiben von *Brassica oleracea*-Infloreszenzen wurde hingegen eine erhöhte Expression von  $\gamma$ -TIP festgestellt (Barrieu et al., 1999).

Im Gegensatz dazu verändern sich die mRNA- und Protein-Konzentrationen von RsTIP1-1 und RsTIP2-1 (homolog zu At- $\gamma$ -TIP und At- $\delta$ -TIP) nicht durch Salz-, Mannitol- und Hormon-Behandlung von *Raphanus sativus* (Suga et al., 2002)

### 2.2.2 Die V-ATPase als Kontrollmarker

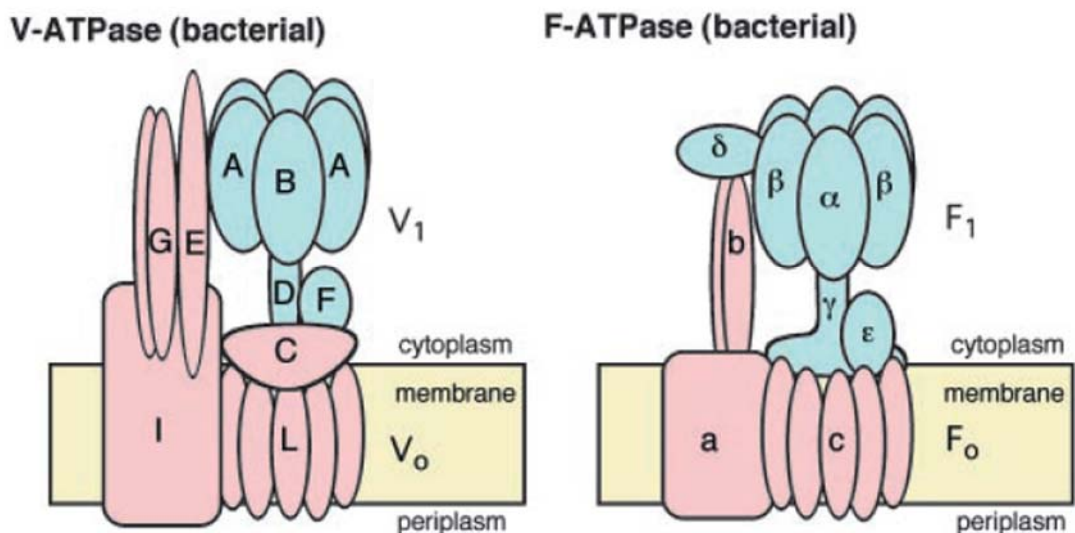
Die Vakuolen-Typ-ATPase (V-ATPase) ist in vielen Organismen in verschiedenste physiologische Prozesse involviert und essentiell für alle Vakuolen (Nishi und Forgac, 2002). Deshalb eignet sich die Immunmarkierung dieses Proteins besonders gut zur Kontrolle der in dieser Arbeit vorgenommenen Immunofluoreszenz-Markierungen von Proteinen, die in den Tonoplast integriert sind, und stellt gleichzeitig einen Nachweis von allen Vakuolentypen dar.

Die V-ATPase in eukaryotischen Organismen befindet sich in den Membranen von Vakuolen, Endosomen, Lysosomen und sekretorischen Vesikeln und ist für die Ansäuerung dieser intrazellulären Kompartimente verantwortlich. In Nierenzellen und Makrophagen kann sie jedoch auch Bestandteil der Plasmamembran sein.

### 2.2.2.1 Struktur und Funktion

Die V-ATPase ist evolutionär eng verwandt mit der F-Typ-ATPase. Bei beiden koppelt ein Rotationsmechanismus ATP-Synthese (bzw. Hydrolyse) und Protonen-Translokation über die Membran (Yoshida et al., 2001; Imamura et al., 2003; Yokoyama et al., 2003). Beide bestehen aus einer integralen Membraneinheit ( $V_0$ , bzw.  $F_0$ ) und einer in das Cytosol ragenden, periferen Einheit ( $V_1$ , bzw.  $F_1$ ), die über eine Stielregion verbunden sind (Abbildung 2). Die Untereinheiten der V- und F-ATPasen zeichnen sich jedoch in der Stielregion durch eine unterschiedliche Struktur aus. Dies führt in dieser Region zu einem signifikant verschiedenem Aufbau. Aufgrund dieser Unterschiede kann die Aktivität der V-ATPase im Gegensatz zur F-ATPase durch Dissoziation und Assoziation der  $V_1$ -Einheit an die  $V_0$ -Einheit reguliert werden (Iwata et al., 2004; Sze, 1999).

Die V-ATPase der Pflanzen kann je nach Pflanzenart aus bis zu zehn verschiedenen Untereinheiten bestehen und ist mit seinem Molekulargewicht von ungefähr 750 kDa der größte Proteinkomplex des Tonoplasten (Drobny, 2002; Maeshima, 2001).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der V- und F-ATPase (aus Iwata, 2004)

## 2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Überraschende Erkenntnis, dass eine pflanzliche Zelle zwei funktionell unterschiedliche Vakuolen aufweisen kann, wirft mehrere grundlegende Fragen neu auf (Holwerda et al., 1990; Holwerda und Rogers, 1992; Hoh et al., 1995; Wilkins und Tiwara, 1995; Paris et al., 1996; Fleurat-Lessard et al., 1997; Jauh et al., 1998; Swanson



et al., 1998; Epimashko et al., 2004). So ist z. B. bisher ausschließlich in den sich entwickelnden Kotyledonen von *Pisum sativum* in den Zellen mit vorhandenen lytischen Vakuolen die *de novo* Biogenese der Proteinspeichervakuolen ultrastrukturell untersucht worden (Hoh et al., 1995). Auch konnte bisher einzig in Kotyledonen von *Pisum sativum* und *Curcubita sp.*, in denen große Konzentrationen von Speicherproteinen eingelagert werden, gezeigt werden, dass die Speicherproteine auf ihrem sekretorischen Weg zu den Proteinspeichervakuolen in zuvor unbekannte Vesikel-Typen (PAC-Vesikel und DVs) sortiert werden (Hara-Nishimura et al., 1998; Hohl et al., 1996).

Die Hinweise, dass auch Zellen von Keimwurzeln zwei unterschiedliche Vakuolen-Typen enthalten können, die auf Immunolokalisierungen im konfokalen Mikroskop beruhen (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1998), machten es deshalb besonders interessant, dieses Gewebe eingehender zu untersuchen. Hinzu kommt, dass im Gegensatz zu dem Kotyledonengewebe in Wurzeln auch in fixierten Geweben ein indirekter zeitlicher Verlauf der Entwicklung ausgewertet werden kann, da der Differenzierungsgrad der Zellen aufgrund ihrer Lage innerhalb der Wurzel abgeschätzt werden kann.

Die zitierten Arbeiten wurden jedoch an Quetschpräparaten durchgeführt und konnten deshalb noch nicht einmal eine Aussage über den genauen Gewebetyp der beobachteten Zellen machen. Trotzdem wurde ein zeitlicher Verlauf der Vakuolen-Entwicklung von den beobachteten Markierungsmustern abgeleitet und die Theorie aufgestellt, dass zunächst zwei unabhängige Vakuolen in einer Zelle existieren, die im Zuge der Entwicklung der Zellen miteinander fusionieren.

Das Ziel der hiermit vorliegenden Arbeit war deshalb, durch die Immunofluoreszenz-Markierung von Schnitten der intakten Gersten- und Erbsenkeimwurzeln die Verteilung der jeweiligen Speicherproteine und der membrangebundenen und als Markerproteine für die Tonoplasten der beiden Vakuolen-Typen angesehenen TIPs ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP) innerhalb der Wurzeln zu ermitteln. Dieses Verteilungsmuster sollte daraufhin im Elektronenmikroskop durch die ultrastrukturelle Untersuchung der ebenfalls intakt fixierten Wurzeln und deren Immunogold-Markierung durch die genaue Lokalisierung innerhalb der Zellen erweitert werden. Durch den genauen Vergleich von unterschiedlich weit differenzierten Zellen sollte ein detailliertes Bild der Biogenese von lytischen Vakuolen und Proteinspeichervakuolen in Keimwurzeln entstehen und zusätzlich durch Immunofluoreszenz-Markierungen von Wurzeln von zehn Tage alten Pflanzen geklärt werden, ob auch in diesen Proteinspeichervakuolen enthalten sind.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchsubjekte und Anzuchtbedingungen**

Untersucht wurden die Sommergerste *Hordeum vulgare* L. der Sorte „Madonna“ (Lochow-Petkus GmbH, Bergen, D) und die Erbse *Pisum sativum* L. der Varietät „Kleine Rheinländerin“ (Wagner, Heidelberg, D).

##### **Keimlingswurzeln**

Die Samen der Gerste wurden 30 Minuten und die Samen der Erbse für mindestens drei Stunden in destilliertem Wasser eingeweicht. Für die Wurzelspitzen der drei Tage alten Keimlinge erfolgte die Keimung im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) auf feuchtem Filterpapier.

##### **Wurzeln von zehn Tage alten Pflanzen**

Für die zehn Tage alten Pflanzen wurden die Samen direkt nach dem Quellen in einem 1/1-Gemisch aus Sand und Torfkultursubstrat (TKS2, Floragard, Oldenburg, D) gepflanzt. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei einer Temperatur von 22 - 25 °C unter künstlicher Belichtung (430W Son-T Agro bulbs, Philips, Eindhoven, NL) von täglich 12 Stunden und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40 - 60 %. Vor der Fixierung der Wurzelspitzen wurde die Erde mit reichlich Wasser vorsichtig weggespült.

##### **Erbsenkotyledonen für die Isolierung von Proteinbodies**

Für die Isolierung der Proteinbodies wurden Erbsenpflanzen im Hydrokultursystem in Klimakammern angezogen. Als Hydrokulturdünger wurde Flori 9 Hydro der Firma Planta (Regenstauf, D) eingesetzt. Im Gewächshaus wurden sie täglich 16 Stunden künstlich belichtet. Die Tagestemperatur lag bei ca. 20 °C. Die Erbsen wurden ca. 4 Wochen nach der Blüte geerntet.

##### **Gerstenblätter für die Isolierung ihrer Membranfraktion**

Für die Aufreinigung der Membranfraktion aus Gerstenblattgewebe wurden die auf Filterpapier angezogenen, drei Tage alten Keimlinge ins Licht gestellt und die jungen Blätter nach weiteren zwei Tagen geerntet.

## **3.2 Antikörper**

### **3.2.1 Primär-Antikörper**

#### **$\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum**

Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die C-terminale Peptidsequenz HQPLAPEDY des  $\alpha$ -TIP aus *Arabidopsis thaliana* L. (Jauh et al., 1998).

#### **$\alpha$ -TIP-Protein-Antiserum**

In Kaninchen gewonnener, polyklonaler Antikörper gegen das 25 kDa große  $\alpha$ -TIP Membranprotein isoliert aus *Phaseolus vulgaris* L. (Johnson et al., 1989).

#### **$\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima**

Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die C-terminale Rettich- $\gamma$ -TIP-Peptidsequenz (RsTIP1-1) INQNGHEQLPTTDY (Suga und Maeshima, 2004).

#### **$\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh**

Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein Peptid (THEQLPTTDY), das von der C-terminalen  $\gamma$ -TIP-Peptidsequenz von Gerste, Reis, *Arabidopsis* und Rettich abgeleitet wurde (Jauh et al., 1998).

#### **Anti-"wheat germ agglutinin" (WGA)**

In Kaninchen entwickelter, polyklonaler Antikörper gegen das Lektin von *Triticum aestivum* L. (Sigma, Taufkirchen, D).

#### **Anti-Vicilin**

Von Kaninchen entwickeltes polyklonales Antiserum gegen Vicilin von *Vicia faba* L. (Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Manteufel, Gatersleben, D).

#### **Anti-Legumin**

Polyklonaler Antikörper entwickelt in Kaninchen gegen aus *Pisum sativum* L. aufgereinigtes Legumin (Hinz et al., 1999).

#### **Anti-V-ATPase**

In Kaninchen entwickeltes polyklonales Antiserum gegen die A-Untereinheit der in das Cytosol ragenden V<sub>1</sub>-Einheit der V-ATPase (Zur Verfügung gestellt von Dr. E. Fischer-Schliebs, Darmstadt, D).

### 3.2.2 Sekundär-Antikörper

Die Immunofluoreszenz-Markierung erfolgte unter Verwendung von in Ziegen entwickelten Antikörpern, die gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet sind und an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die Licht-Absorption des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt bei einer Wellenlänge von  $496 \pm 5$  nm und die Emission bei  $518 \pm 5$  nm (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H + L) [2 mg/ml]; Molecular Probes, Leiden, NL).

Für die immunocytochemische Markierung der Ultradünnschnitte wurden in Ziegen entwickelte Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline verwendet, die mit kolloidalem Gold der Größe 5, 10 oder 15 nm konjugiert sind (EM.GAR 5, 10 oder 15; British BioCell International, Cardiff, GB).

Für das Western-Blotting wurden Sekundär-Antikörper der Firma Sigma (Taufkirchen, D) verwendet, die gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet sind und konjugiert an Meerrettich-Peroxidase vorliegen.

## 3.3 Lichtmikroskopie

### 3.3.1 Fixierung, Entwässerung und Einbettung

Die Fixierung und Einbettung der Wurzelspitzen für die Immunofluoreszenz-Markierung erfolgte nach der von Baluška und Mitarbeitern beschriebenen Methode (1992). Diese ermöglicht einen besseren Erhalt der Antigenizität, da das Gewebe durch die Verwendung eines Einbettungsmediums mit besonders niedriger Schmelztemperatur nicht über  $37^\circ\text{C}$  erhitzt werden muss.

#### Lösungen:

PIPES-Puffer:      50 mM PIPES/KOH, pH 6,9  
                         5 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
                         5 mM EGTA

Fixativ:            3,7 % ( $^w/v$ ) Formaldehyd  
                         in PIPES-Puffer

PBS: 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4  
150 mM NaCl

Färbelösung: 0,01 % ( $^w/v$ ) Toluidine Blau in 99 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt)

Wachs: 90 % ( $^w/w$ ) Polyethylenglycol Disterat (400 g/mol)  
10 % ( $^w/w$ ) 1-Hexadecanol

Polyethylenglycol bei 65° C schmelzen, Hexadecanol zugeben und vier Stunden rühren lassen. Auf Raumtemperatur abgekühlt kann das Wachs aufbewahrt werden und vor der Verwendung bei 37° C geschmolzen werden.

### Durchführung:

Die ersten 3 mm der Wurzelspitzen von Gersten- und Erbsenkeimlingen und 10 Tage alten Gersten- und Erbsenpflanzen wurden mit einer Rasierklinge abgeschnitten und nach folgendem Schema fixiert, entwässert, gefärbt und eingebettet:

### Fixierung:

Fixativ	60 min bei RT
PIPES-Puffer	30 min bei RT
PBS	15 min bei RT

### Entwässerung:

30 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt) in PBS	30 min bei RT
50 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt) in PBS	30 min bei RT
70 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt) in PBS	30 min bei RT
99 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt)	30 min bei RT

### Färbung:

Färbelösung	10 min bei RT
-------------	---------------

### Waschen:

99 % ( $^v/v$ ) Ethanol (vergällt)	5 min bei RT
------------------------------------	--------------

**Wachsinfiltration und Einbettung:**

Bei 37° C wurde das Ethanol mit dem gleichen Volumen flüssigen Wachses überschichtet und über Nacht inkubiert. Die Gewebestücke lagen am Boden des Gefäßes und wurden von dem langsam absinkenden Wachs infiltriert. Am darauf folgenden Morgen wurde vorsichtig von oben zunächst das Ethanol und dann das Wachs abgesaugt und durch reines Wachs ersetzt. Nach zwei stündiger Inkubation wurden die Gewebestücke mit dem Wachs in Flacheinbettungsformen aus weichem Gummi gegeben. Das Wachs härtete bei RT innerhalb von 20 Stunden vollständig aus.

**3.3.2 Mikrotomie**

Mit einer Rasierklinge wurden aus den Wachsböckchen kleine Würfel geschnitten, an deren möglichst geraden, rechteckigen Grundflächen die gefärbten Gewebestücke im Wachs zu sehen waren. Diese wurden dann mit geschmolzenem Wachs mit der den Gewebestücken gegenüberliegenden Fläche jeweils auf eine Halterung befestigt und diese in das Mikrotom eingespannt (Mikrotom, Jung, Nußloch, D). Mit Hilfe einer Stahlklinge (16 cm Stahlklinge mit c-Schliff, Leica, Bensheim, D) wurden zehn Mikrometer dünne Schnitte hergestellt, die ein Schnittband bildeten, das mit einem Pinsel geführt wurde.

Das Schnittband wurde mit einer Rasierklinge in kleine Teilstücke von ca. 3 - 5 Schnitten geteilt und auf Glasobjektträger gelegt, die zuvor mit zehn Mikroliter Glycerolalbumin eingerieben worden waren. Durch Unterspülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte gestreckt. Nach dem Absaugen des Wassers durch Filterpapier wurden die Schnitte mindestens 15 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

### 3.3.3 Entwachsen der Schnitte

Zur Entfernung des Wachses werden die Objektträger nach folgendem Schema mit Ethanol inkubiert und danach schrittweise, damit die Schnitte sich nicht vom Objektträger lösen, in den für die Immunmarkierung verwendeten Puffer überführt:

99 % (v/v) Ethanol (vergällt)	4 × 10 min
90 % (v/v) Ethanol (vergällt) in PBS	10 min
70 % (v/v) Ethanol (vergällt) in PBS	10 min
50 % (v/v) Ethanol (vergällt) in PBS	10 min
25 % (v/v) Ethanol (vergällt) in PBS	10 min
PBS	10 min

### 3.3.4 Immunofluoreszenz-Markierung

#### Lösungen:

BSA-Blocklösung: 1 % (w/v) BSA in PBS

Glycin-Blocklösung: 20 mM Glycin in PBS

Waschlösung: 0,1 % (w/v) BSA in PBS

Primär-Antikörperlösungen (siehe Kap. 3.2.1):

Anti- $\alpha$ -TIP-Peptid	1 : 50 od. 1 : 25	in Waschlösung
Anti- $\alpha$ -TIP-Protein	1 : 50	in Waschlösung
Anti- $\gamma$ -TIP-Peptid (Maeshima)	1 : 400 od. 1 : 50	in Waschlösung
Anti- $\gamma$ -TIP-Peptid (Jauh)	1 : 50	in Waschlösung
Anti-WGA	1 : 300	in Waschlösung
Anti-Vicilin	1 : 100 od. 1 : 50	in Waschlösung

Sekundär-Antikörperlösung (siehe Kap.3.2.2 ):

Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Rabbit     1 : 50     in Waschlösung

Abdeckmedium:

100 mg p-Phenylenediamine wurde in 10 ml PBS gelöst, 90 ml Glycerin zugegeben und mit Tris auf pH 8,0 titriert.

Das Abdeckmedium wurde in einer vor Licht geschützten Flasche bei -20 °C gelagert und vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht.

### **Durchführung:**

Für die Immunofluoreszenz-Markierung wurden die Gewebeschnitte eines Objektträgers mit jeweils 100 Mikroliter der folgenden Lösungen inkubiert:

BSA-Blocklösung	5 min
Glycin-Blocklösung	5 min
Primär-Antikörperlösung	1 h
Waschlösung	3 × 10 min
Sekundär-Antikörperlösung	1 h
Waschlösung	3 × 5 min
PBS	3 × 5 min

Nach der Markierung wurde das PBS vom Objektträger abgesaugt, die Schnitte mit einem Tropfen Abdeckmedium bedeckt und ein Deckgläschen aufgesetzt. Das an den Rändern des Deckgläschens austretende, überschüssige Abdeckmedium wurde mit Filterpapier abgesaugt und die Ränder mit Nagellack verschlossen.



### 3.3.5 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Die Auswertung der Immunofluoreszenz-Markierung erfolgte am inversen Mikroskop Axiovert 200 der Firma Zeiss (Göttingen, D). Sowohl das Anregungs-Licht der HBO Quecksilberdampf-Lampe (Osram, D) als auch das von dem Fluoreszenzfarbstoff des Alexa Flour 488-Antikörpers (siehe Kap.3.2.2) emittierte Licht wurde durch den Filter FT 510 (Zeiss, Göttingen, D) auf die Wellenlängenbereiche von 450 bis 490 nm und 515 bis 565 nm reduziert.

Die Aufnahmen der Fluoreszenzmarkierungen wurden unter Verwendung der Belichtungsautomatik mit der Digitalkamera G2 von Canon hergestellt.

## 3.4 Elektronenmikroskopie

### 3.4.1 Strukturfixierung der Erbsen- und Gerstenwurzelspitzen

#### Fixierung und Entwässerung:

Für die Primärfixierung des Gewebes wurde eine Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid-Mischung verwendet, die eine relativ schnelle Quervernetzung der Polypeptidketten und der Lipide gewährleistet. Die Sekundärfixierung erfolgte durch Inkubation mit Osmiumtetroxid (in Anlehnung an Palade, 1952). Zur Erhöhung des Kontrastes wurde Uranylacetat, das sich an Nucleinsäuren und Proteine anlagert, eingesetzt.

#### Lösungen:

Waschpuffer: 50 mM Cacodylsäure Natriumsalz/HCl pH 7,0

Primärfixativ: 1 % (w/v) Glutaraldehyd  
1 % (w/v) OsO<sub>4</sub> in Waschpuffer

Sekundärfixativ: 2% (w/v) OsO<sub>4</sub> in Waschpuffer

Kontrastmittel: 2 % (w/v) Uranylacetat in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Acetonlösungen: 30 % (v/v) Aceton p.a. in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
50 % (v/v) Aceton p.a. in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
70 % (v/v) Aceton p.a. in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
90 % (v/v) Aceton p.a. in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
100 % (v/v) Aceton p.a.

**Durchführung:**

Die ersten 4 mm der Wurzelspitzen von drei Tage alten Gersten- und Erbsenkeimlingen wurden mit einer Rasierklinge abgetrennt und nach folgendem Protokoll behandelt:

Primärfixativ	1 h bei 4 °C
Waschpuffer	4 × 15 min 4 °C
Sekundärfixativ	1 h bei 4 °C
Waschpuffer	2 × 15 min bei 4 °C
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	2 × 15 min bei 4 °C
Kontrastmittel	ü. N. bei 4 °C
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	4 × 15 min bei RT
30 % (v/v) Aceton p.a.	10 min bei RT
50 % (v/v) Aceton p.a.	10 min bei RT
70 % (v/v) Aceton p.a.	10 min bei RT
90 % (v/v) Aceton p.a.	10 min bei RT
100 % (v/v) Aceton p.a.	2 × 10 min bei RT

**Kunstharzinfiltration und Polymerisation**

Die Einbettung der fixierten und entwässerten Gersten- und Erbsenkeimwurzeln erfolgte in dem Kunstharz Spurr. Dieses von Spurr (1969) entwickelte Epoxidgemisch zeichnet sich durch geringe Viskosität aus und dringt deshalb gut in das Gewebe ein.

**Lösungen:**

Spurr:

45 g ERL (4221) (3,4-Epoxyethylcyclohexyl-methyl-3,4-epoxycyclohexylcarboxylate)

27 g DER 736

117 g NSA (Nonenylsuccinic anhydride)

1,8 g Dimethylaminoethanol

25 % (v/v) Spurr in Aceton p.a.

50 % (v/v) Spurr in Aceton p.a.

75 % (v/v) Spurr in Aceton p.a.

**Durchführung:**

25 % (v/v) Spurr in Aceton p.a. 45 min bei RT

50 % (v/v) Spurr in Aceton p.a. 45 min bei RT

75 % (v/v) Spurr in Aceton p.a. 45 min bei RT

100 % (v/v) Spurr ü. N. bei 4 °C

100 % (v/v) Spurr 4 h bei RT

Die Wurzelspitzen wurden in Flacheinbettungsformen aus weichem Gummi eingebettet und zur Polymerisation des Harzes für mindestens 24 Stunden in einen 60 °C warmen Trockenschrank gestellt.

### 3.4.2 Fixierung der Erbsen- und Gerstenwurzelspitzen für die Immunogoldmarkierung

**Fixierung und Entwässerung:****Lösungen:**

Waschpuffer: 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Primärfixativ: 1,5 % (w/v) Paraformaldehyd

0,25 % (w/v) Glutaraldehyd in Waschpuffer

Ethanollösungen:	30 % (v/v)	Ethanol p.a. in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	50 % (v/v)	Ethanol p.a. in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	70 % (v/v)	Ethanol p.a. in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
	100 % (v/v)	Ethanol p.a.

**Durchführung:**

Die ersten 4 mm der Wurzelspitzen von drei Tage alten Gersten- und Erbsenkeimlingen wurden mit einer Paraformaldehyd/Glutaraldehyd-Mischung fixiert. Diese bewirkt eine Quervernetzung benachbarter Polypeptidketten, setzt dabei jedoch die Antigenizität der Probe nicht so stark herab wie eine reine Glutaraldehyd-Fixierung (Dieckmann, 1994). Des Weiteren wurde, um die Antigene optimal zu erhalten, auf eine Sekundärfixierung mit Osmiumtetroxid und eine Kontrastierung mit Uranylacetat verzichtet. Die nun folgende Entwässerung erfolgte unter progressiver Herabsetzung der Temperatur („progressive lowering of temperature technique“ - PLT).

Bei allen folgenden Schritten wurde die genaue Einhaltung der angegebenen Temperatur durch Vorkühlen der benötigten Lösungen und Gerätschaften und Arbeiten in der mit Ethanol gefüllten Kühlkammer der AFS („automatic freeze substitution system“ – automatische Gefriersubstitutions-Anlage; Leica, Bensheim, D) gewährleistet.

Primärfixativ	30 min bei RT
	ü. N. bei 4 °C
30 % (v/v) Ethanol p.a.	30 min bei 4 °C
50 % (v/v) Ethanol p.a.	15 min bei 4 °C
	45 min bei -20 °C
70 % (v/v) Ethanol p.a.	60 min bei -20 °C
100 % (v/v) Ethanol p.a.	2 × 60 min bei -20 °C

**Kunstharzinfiltration und Polymerisation:**

Für die Einbettung der fixierten und entwässerten Gersten- und Erbsenkeimwurzeln wurde das Lowicrylharz HM20 gewählt, das eine Polymerisation durch UV-Licht bei -35° C ermöglicht.

**Lösungen:**

HM20 (Lowicryl HM Kit, Polyscience, Eppelheim, D):

29,8 g Crosslinker D

170,2 g Monomer E

1 g Initiator C

25 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a.

50 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a.

75 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a.

**Durchführung:**

25 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a. 45 min bei -20 °C

50 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a. 45 min bei -20 °C

75 % (v/v) HM20 in Ethanol p.a. 45 min bei -20 °C

100 % (v/v) HM20 ü. N. bei -35 °C

100 % (v/v) HM20 4 h bei -35 °C

Die Wurzelspitzen wurden in Gelatinekapseln eingebettet und durch einen speziellen Deckel, der das Aufhängen der Gelatinekapseln ermöglichte, ohne Lufteinschlüsse verschlossen. Die Polymerisation des Lowicrylharzes erfolgte durch indirekte UV-Licht-Einstrahlung bei -35° C. Um eine optimale Abführung der bei der exothermen Polymerisationsreaktion entstehenden Wärme zu gewährleisten, hingen die Gelatinekapseln im gekühlten Ethanol. Um die Schnittfestigkeit des Harzes zu optimieren, wurden die Harzblöckchen nach Entfernen der Gelatinekapseln drei Tage direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt.

### 3.4.3 Präparation der Trägernetzchen (Grids)

Formvarlösung:

0,5 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Polyvinylformaldehyd in wasserfreiem Chloroform

Als Objektträger für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden Kupfer-Grids der Maschenzahl 100 mit hexagonalen Feldern (Plano, Marburg, D) bzw. Nickel-Grids der gleichen Maschenzahl für die Immunogoldmarkierungen verwendet.

Um den Ultradünnschnitten auf den Trägernetzchen zusätzlichen Halt zu geben, mussten die Grids mit einem Kunststofffilm überzogen werden. Dafür wurden gründlich gereinigte Glasobjektträger in einen Tropftrichter mit Formvarlösung gestellt. Nach 30 - 60 Sekunden wurde die Flüssigkeit abgelassen, wobei ein gleichmäßiger, dünner Film auf dem Objektträger zurückblieb. Nach dem Einritzen der Ränder mit einer Rasierklinge konnte der Film durch langsames, schräges Eintauchen des Objektträgers in eine Wasserschale auf der staubfreien Oberfläche abflottieren. Die schwimmende Folie wurde nun mit Grids, deren glänzende, glatte Seite nach oben zeigte, belegt, danach durch Auflegen eines Papierstreifens aufgenommen, in einer Petrischale mindestens 12 Stunden getrocknet und staubfrei bis zur Verwendung aufbewahrt.

### 3.4.4 Ultramikrotomie

Unter dem Binokular wurden die Kunststoffblöcke zunächst mit einer Rasierklinge in der Art zurechtgeschnitten, dass die Probe in einer herausstehenden Pyramide mit glatter, trapezförmiger Grundfläche lag. Nach dieser Behandlung, die als "Trimmen" bezeichnet wird, konnte die Probe mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut S, Reichert, Österreich) mit eingespanntem Diamantmesser (Diatome, Bienne, Schweiz) geschnitten werden. Die entstehenden Schnitte schwammen auf der Wasseroberfläche (H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) des am Messer befestigten Wassertroges und konnten aufgrund ihrer Interferenzfarben auf ihre Dicke beurteilt werden. Dabei schimmerten Schnitte, die im Bereich der idealen Schnittdicke bis 90 nm lagen, grau bis silbergrau. Diese wurden dann, außer bei den für die doppelte Immunmarkierung vorgesehenen Schnitten (siehe Kap.3.4.6), auf der mit dem Formvarfilm beschichteten Seite der Objektträgernetzchen aufgenommen.

### 3.4.5 Einfache Immunogoldmarkierung

**Lösungen:**

PBS: 10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,4  
150 mM NaCl

Blocklösung: 3 % ( $w/v$ ) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS

Waschlösung: 1 % ( $w/v$ ) BSA in PBS

Primär-Antikörper (siehe Kap.3.2.1):

Anti-WGA	1:400
Anti- $\alpha$ -TIP-Peptid	1:50
Anti- $\gamma$ -TIP (Maeschima)	1:50
Anti- $\gamma$ -TIP (Jauh)	1:50
Anti-Vicilin	1:50
Anti-Legumin	1:50

Sekundär-Antikörper (siehe Kap.3.2.2):

Goat-Anti-Rabbit IgG:10 nm Gold 1:50 verdünnt in Waschlösung

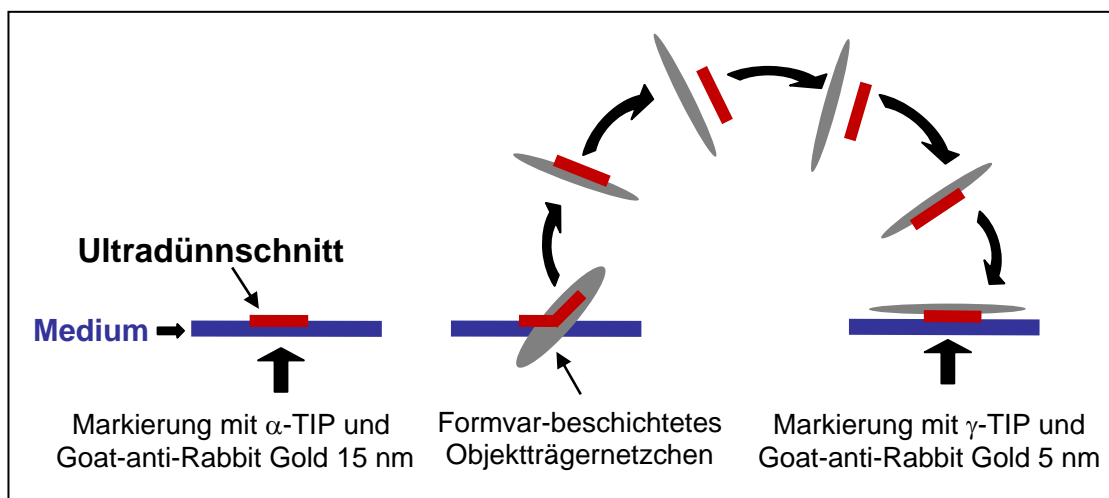
**Durchführung:**

Die Grids wurden bei Raumtemperatur mit den Gewebeschnitten nach unten nach folgendem Schema auf Tropfen der jeweiligen Lösung gelegt.

Blocklösung	30 min
Primär-Antikörper	1 h
Waschlösung	$3 \times 10$ min
Sekundär-Antikörper	1 h
Waschlösung	$2 \times 5$ min
$H_2O$ bidest.	$3 \times 5$ min

### 3.4.6 Doppelte Immunogoldmarkierung

Da alle zur Verfügung stehenden Antiseren aus Kaninchen stammen, musste für eine gleichzeitige Markierung zweier Proteine eine Methode gefunden werden, die eine Kreuzreaktion der beiden Markierungen ausschließt. Deshalb wurden die Schnitte direkt nach dem Schneiden zunächst von einer Seite markiert und erst dann mit dem Formvarfilm bedeckten Grid so aufgenommen, dass die schon markierte Seite des Schnittes abgedeckt war. Die zweite Markierung konnte dann, wie bei einer einfachen Markierung, an der frei vorliegenden, anderen Seite des Schnittes vorgenommen werden (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Markierung mit zwei Primär-Antikörpern aus Kaninchen.**

Die erste Markierung der auf dem Medium schwimmenden Schnitte mit  $\alpha$ -TIP und Sekundär-Antikörpern mit 15 nm großen Goldpartikeln erfolgt von unten. Durch das Aufnehmen der Schnitte mit einem Formvar-beschichteten Objektträgernetzchen wird die erste Markierung abgedeckt und eine Kreuzreaktion zwischen der ersten und zweiten Markierung unterbunden.

Die zweite Markierung mit  $\gamma$ -TIP und Sekundär-Antikörpern mit 5 nm großen Goldpartikeln wird an der anderen Schnittseite vorgenommen.

**Lösungen:**

PBS: 10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,4  
150 mM NaCl

Blocklösung: 3 % ( $w/v$ ) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS

Waschlösung: 1 % ( $w/v$ ) BSA in PBS



Primär-Antikörper (siehe Kap.3.2.1):

Anti- $\alpha$ -TIP-Peptid 1:50 verdünnt in Waschlösung

Sekundär-Antikörper (siehe Kap.3.2.2):

Goat-Anti-Rabbit IgG:15 nm Gold 1:50 verdünnt in Waschlösung

### **Durchführung:**

Die Schnitte wurden direkt nach dem Schneiden von der Wasseroberfläche mit einem Wassertropfen in einer Drahtöse aufgenommen und auf PBS in einem Tefloninkubationsgefäß gesetzt. Für die erste Immunogold-Markierung der unteren Schnittseite wurden die zu wechselnden Lösungen vorsichtig, so weit wie möglich von unten abgesaugt und die nächste Lösung behutsam untergespült. Die Markierung erfolgte nach folgendem Schema:

Blocklösung	1 × 2 min
	1 × 30 min
Primär-Antikörper	1 h
Waschlösung	1 × 2 min
	3 × 10 min
Sekundär-Antikörper	1 h
Waschlösung	3 × 5 min
H <sub>2</sub> O bidest.	3 × 5 min

Nach der ersten Immunogold-Markierung wurden die Schnitte vorsichtig von unten auf ein mit einem Formvarfilm beschichteten Grid aufgenommen. Die zweite Immunogold-Markierung erfolgte wie unter Kap.3.4.5 beschrieben.

### 3.4.7 Nachkontrastierung der Spurr-Ultradünnschnitte

Für die Nachkontrastierung von Ultradünnschnitten von in Spurr eingebetteten Geweben wurde in Methanol gelöstes Uranylacetat verwendet, um die vollständige Benetzung der stark hydrophoben Harzschnitte mit dem Kontrastmittel zu gewährleisten.

#### Lösungen:

Uranylacetatlösung: 3 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Uranylacetat in 70 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Methanol p.a.

Methanollösung: 50 % (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) Methanol in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Bleicitratlösung: 0,3 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Bleicitrat in 1 M NaOH

#### Durchführung:

Für die Nachkontrastierung wurden die Grids für 5 Minuten auf einen Tropfen der Uranylacetatlösung gelegt, zunächst gründlich mit der Methanollösung und dann mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Als zweiter Nachkontrastierungsschritt diente eine Bleicitrat-Inkubation für 5 Minuten. Um das überschüssige Bleicitrat zu entfernen, wurde erneut mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Die getrockneten Grids konnten dann im Transmissionselektronenmikroskop (CM 10, Philips, Eindhoven, NL) untersucht werden.

### 3.4.8 Nachkontrastierung der Lowicryl-Ultradünnschnitte

#### Lösungen:

Uranylacetatlösung: 3 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Uranylacetat in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Bleicitratlösung: 0,3 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Bleicitrat in 1 M NaOH

#### Durchführung:

Die Nachkontrastierung von Lowicryl-Ultradünnschnitten erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit wässrigem Uranylacetat, gründlichem Waschen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 5-minütiger Bleicitrat-Inkubation. Nach intensivem Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> konnten die

getrockneten Grids im Transmissionselektronenmikroskop (CM 10, Philips, Eindhoven, NL) ausgewertet werden.

### **3.5 Proteinbiochemie**

#### **3.5.1 Isolierung der Membranfraktionen aus Gersten- und Erbsenwurzeln**

##### **Lösungen:**

Homogenisationspuffer:

- 40 mM HEPES/KOH, pH 7,0
- 300 mM Saccharose
- 10 mM KCl
- 3 mM MgCl

Folgende Proteaseinhibitoren wurden dem Homogenisationspuffer frisch vor dem Gebrauch in Form von Stammlösungen zugesetzt:

- 1 mM DTT
- 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin
- 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin
- 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin
- 2 mM o-Phenanthrolin
- 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  E-64

##### **Durchführung:**

Um den proteolytischen Abbau gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die ersten 1 - 2 mm der Keimlingswurzeln wurden mit einer Rasierklinge abgeschnitten und mit Homogenisationspuffer und Seesand gemörsert. Das Rohhomogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, D) und zwei Lagen Mull filtriert und anschließend zehn Minuten bei  $1.000 \times g_{\text{max}}$  in einem Ausschwingrotor (Sorvall RC 5B, Rotor: HB 4) zentrifugiert. Der Überstand wurde weitere 20 Minuten bei  $12.000 \times g_{\text{max}}$  im gleichen Rotor zentrifugiert. Das Pellet ( $P_{-1.000g}$ ) wurde gepottet und zunächst bei 4 °C aufbewahrt. Der Überstand wurde eine Stunde bei  $100.000 \times g_{\text{max}}$  in einer Ultrazentrifuge (Kontron, Centrikon T-1080; Rotor: TFT 50.38) zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation, die cytosolische

Fraktion, wurde nicht weiter verwendet. Das Pellet ( $P_{1.000-128.000g}$ ) wurde ebenfalls durch Pottern homogenisiert.

Für die Membranpellets ( $P_{1.000-12.000g}$ ) und ( $P_{12.000-128.000g}$ ) wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (siehe Kap.3.5.5) bestimmt. Die Proteine der Lösung wurden nach der von Wessel und Flügge entwickelten Chloroform/Methanol-Fällung (siehe Kap.3.5.6) gefällt. Das getrocknete Protein wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.5.2 Isolierung von Proteinkörpern (Proteinbodies) aus Erbsenkotyledonen

Die Proteinbodies der Erbsenkotyledonen-Zellen wurden nach dem von Hohl und Mitarbeitern beschriebenen Protokoll aufgereinigt (1996).

#### Lösungen:

Homogenisationspuffer:

0,1 M MOPS/KOH, pH 5,5

0,6 M Sorbit

1 mM EDTA (di-Na-Salz) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Folgende Proteaseinhibitoren wurden dem Homogenisationspuffer frisch vor dem Gebrauch in Form von Stammlösungen zugesetzt:

0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstadin

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin

40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Phenantrolin

Ficolllösung: 5 % ( $^w/v$ ) Ficoll 400 in Homogenisationspuffer

#### Durchführung:

Um den proteolytischen Abbau gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Für die Isolierung von Proteinbodies aus Erbsenkotyledonen wurden die Erbsen ca. 4 Wochen nach der Blüte geerntet (siehe Kap.3.1). Die Erbsenkotyledonen wurden von der Samenschale befreit, gewogen, mit dem zweifachen Volumen Homogenisationspuffer versetzt und mit der Rasierklinge fein zerhackt. Das Rohhomogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, D) und zwei Lagen Mull

filtriert und anschließend eine Minute bei  $90 \times g_{\max}$  (Labofuge I; Heraeus-Christ GmbH, Osterode am Harz, D) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die Ficolllösung geladen und für zehn Minuten bei  $460 \times g_{\max}$  in einem Ausschwingrotor (Sorvall RC 5B, Rotor: HB 4) zentrifugiert. Das Sediment wurde in Homogenisationspuffer resuspendiert und der Ficoll-Schritt zweimal wiederholt.

### 3.5.3 Isolierung der Membranfraktion aus Gerstenblättern

#### Lösungen:

Homogenisationspuffer:

- 40 mM HEPES/KOH, pH 7,0
- 300 mM Saccharose
- 10 mM KCl
- 3 mM MgCl

Folgende Proteaseinhibitoren wurden dem Homogenisationspuffer frisch vor dem Gebrauch in Form von Stammlösungen zugesetzt:

- 1 mM DTT
- $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin
- $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin
- $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin
- 2 mM o-Phenanthrolin
- $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  E-64

#### Durchführung:

Um den proteolytischen Abbau gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Gerstenblätter (siehe Kap.3.1) wurden mit Homogenisationspuffer und Seesand gemörsert. Das Rohhomogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Calbiochem, Bad Soden, D) und zwei Lagen Mull filtriert und anschließend 20 Minuten bei  $18.000 \times g_{\max}$  in einem Ausschwingrotor (Sorvall RC 5B, Rotor: HB 4) zentrifugiert. Der Überstand wurde eine weitere Stunde bei  $100.000 \times g_{\max}$  in einer Ultrazentrifuge (Kontron, Centrikon T-1080; Rotor: TFT 50.38) zentrifugiert.

Das Sediment (Membranfraktion) wurde mit Hilfe eines Potters in einem geringen Volumen Homogenisationspuffer resuspendiert und von peripheren Membranproteinen befreit (siehe Kap.3.5.4).

### 3.5.4 Entfernung der peripheren Membranproteine

#### Lösungen:

MES-Puffer: 20 mM MES/KOH, pH 7,0 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Kaliumjodidlösung:

1 M KJ in MES-Puffer

#### Durchführung:

Um den proteolytischen Abbau gering zu halten, wurden alle Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Die Membranprotein-Fractionen wurden 1:10 mit der Kaliumjodidlösung verdünnt, 30 Minuten geschüttelt und eine Stunde bei  $100.000 \times g_{\max}$  in der Ultrazentrifuge (Kontron, Centrikon T-1080; Rotor: TFT 50.38) zentrifugiert. Das Sediment wurde in MES-Puffer aufgenommen und gepottert. Die Membranen wurden bei  $100.000 \times g_{\max}$  in der TL 103 Zentrifuge der Firma Beckmann für 45 Minuten sedimentiert und anschließend in MES-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Probe wurde nach der Methode von Lowry (siehe Kap.3.5.5) ermittelt und die Proteine mit der Chloroform/Methanol-Fällung nach Wessel und Flügge (siehe Kap.3.5.6) gefällt. Die getrockneten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

### 3.5.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Der quantitative Nachweis von Proteinen nach Lowry und Mitarbeitern (1951) wurde gewählt, weil er besonders für Membranproteine genauer und empfindlicher ist als die Methode von Bradford (1976). Die Grundlage des Verfahrens ist die Bildung eines Biuret-Komplexes aus Cu<sup>2+</sup>-Ionen und Peptidbindungen in alkalischen Lösungen. Dieser Komplex reduziert das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, wodurch eine intensive Blaufärbung entsteht.

**Lösungen:**

**Kupfer-Tartrat-Karbonat-Reagenz (KTC):**

Lösung 1: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_2$  in 40 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Lösung 2: 0,2 g  $\text{K}_2$ -Tartrat ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6$ )

0,1 g  $\text{CuSO}_4$  in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Lösung 1 und Lösung 2 wurden vereinigt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 100 ml aufgefüllt.

Reagenz A: 10 % ( $^{\text{w}}/\text{v}$ ) SDS in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

KTC-Lösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

0,8 M NaOH in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , SDS, KTC und NaOH wurden im Verhältnis 5:1:1:1 gemischt.

Reagenz B: Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  im Verhältnis 1:6 ( $^{\text{v}}/\text{v}$ ) verdünnt.

**Durchführung:**

Zu 10  $\mu\text{l}$  Probe wurde bei Raumtemperatur 1 ml Reagenz A gegeben und die Lösung gut gemischt. Nach genau zehn Minuten wurde der Inkubationsansatz mit 250  $\mu\text{l}$  Reagenz B versetzt und erneut gründlich gemischt. Innerhalb von 30 Minuten entwickelte sich der blaue Farbkomplex. Die Absorptionsmessung wurde bei 750 nm gegen einen Blindwert an einem Spektralphotometer (DU 640 B Spectrophotometer, Beckman Coulter) durchgeführt.

Parallel wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 0 - 15  $\frac{\text{g}}{\text{l}}$  für die Erstellung einer Eichkurve gemessen.

Zur Berechnung wird ein Wert aus dem niedrigen (n) und ein zweiter aus dem hohen Konzentrationsbereich (h) der Eichkurve entnommen. Die Proteinmenge einer Probe errechnet sich aus:

$$\mu\text{g Protein} = (A_{750} \cdot I)^s$$

$$s = \log(h/n) : \log(A_{750}^h / A_{750}^n)$$

$$I = \text{antilog}(\log h/s - \log A_{750}^h)$$

$A_{750}$  = Absorption bei 750 nm

h =  $\mu\text{g}$  Protein der Probe mit hoher Proteinkonzentration

$A_{750}^h$  = deren Absorption bei 750 nm

n =  $\mu\text{g}$  Protein einer Probe mit niedriger Proteinkonzentration

$A_{750}^n$  = deren Absorption bei 750 nm

### 3.5.6 Chloroform/Methanol-Fällung

Für die Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984) wurden 100  $\mu\text{l}$ -Aliquots der Probe mit 400  $\mu\text{l}$  Methanol p.a., 100  $\mu\text{l}$  Chloroform p.a. und 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest. versetzt, gründlich vermischt und in der Eppendorfszentrifuge eine Minute bei  $9.000 \times g_{\text{max}}$  zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen. Die vom Protein gebildete Interphase und die untere Chloroform-Phase wurden mit 300  $\mu\text{l}$  Methanol p.a. versetzt. Anschließend wurde das Protein sedimentiert (3 min bei  $9.000 \times g_{\text{max}}$ , Eppendorfszentrifuge). Nach dem Absaugen des Überstandes konnte das Protein getrocknet werden.

## 3.6 Elektrophoretische Methoden

Zur Auftrennung einzelner Proteine nach ihrer Molekularmasse wurde die **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli, 1970) verwendet. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass die Proteine in einem Gel mit geringer Polyacrylamidkonzentration und leicht basischem pH (Sammelgel) in einer Ebene fokussiert werden, wodurch die Trennschärfe im Trenngel erheblich erhöht wird. Die durch die SDS-Anlagerung negativ geladenen, denaturierten Proteine wandern durch das Trenngel, das eine höhere Polyacrylamidkonzentration und einen



schwach sauren pH-Wert aufweist, mit einer Geschwindigkeit, die negativ proportional zu ihrem Molekulargewicht ist.

### 3.6.1 Probenvorbereitung

#### Lösungen:

Probenpuffer: 230 mM Tris/HCl, pH 6,8  
2 % (w/v) SDS  
36 % (v/v) Glycerin  
0,05 % (w/v) Bromphenolblau (Na-Salz)  
4,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O bidest.

#### Durchführung:

Das nach der Chloroform/Methanol-Fällung (siehe Kap.3.5.6) getrocknet vorliegende Protein wurde in einer Konzentration von 1 bzw. 2 µg/µl Probenpuffer resuspendiert. Dann wurde das Protein für zehn Minuten bei 60 °C im Heizblock denaturiert und danach 5 Minuten geschüttelt, um das Sediment vollständig zu solubilisieren. Nach einer kurzzeitigen Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge wurde die Probe auf das Gel aufgetragen.

### 3.6.2 Molekularmassen-Marker

Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde der „Prestained Protein Marker“ der Firma New England Biolabs (Frankfurt a. M., D) verwendet. Dieser enthält folgende Proteine:

„Maltose-Binding-Protein“ und β-Galactosidase Fusionsprotein.....	175 kDa
„Maltose-Binding-Protein“ und Paramyosin Fusionsprotein .....	83 kDa
Glutamat Dehydrogenase .....	62 kDa
Aldolase .....	47,5 kDa
Triosephosphat Isomerase.....	32,5 kDa
β-Lactoglobulin A .....	25 kDa
Lysozym.....	16,5 kDa
Aprotinin .....	6,5 kDa

### 3.6.3 Herstellung der diskontinuierlichen Gele

Die verwendeten Polyacrylamidgele setzten sich aus einem 4,5 %igen Sammelgel ( $145 \times 35 \times 1$  mm) mit dem pH-Wert 6,8 und einem 14 %igen Trenngel ( $145 \times 125 \times 1$  mm) mit dem pH-Wert 8,8 zusammen.

#### Lösungen:

Sammelgellösung: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8

0,1 % ( $^w/v$ ) SDS

9 % ( $^w/v$ ) Glycerin

4,5 % ( $^w/v$ ) Acrylamid

0,12 % ( $^w/w$ ) N,N'-Methylenbisacrylamid

0,1 % ( $^w/v$ ) Ammoniumpersulfat

0,1 % ( $^v/v$ ) TEMED in  $H_2O_{\text{bidest.}}$

Trenngellösung: 375 mM Tris/HCl, pH 8,8

0,1 % ( $^w/v$ ) SDS

14 % ( $^w/v$ ) Acrylamid

0,37 % ( $^w/w$ ) N,N'-Methylenbisacrylamid

0,067 % ( $^w/v$ ) Ammoniumpersulfat

0,05 % ( $^v/v$ ) TEMED in  $H_2O_{\text{bidest.}}$

#### Durchführung:

Zunächst wurde das Trenngel zügig zwischen die mit Aceton entfetteten Glasscheiben gegossen und mit 2-Propanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach einer Stunde bei RT konnte das 2-Propanol durch Spülen mit  $H_2O_{\text{bidest.}}$  entfernt und das Sammelgel auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen werden. Die Probentaschen wurden mit einem entsprechenden Kamm geformt. Nach einer weiteren Stunde war das Gel auspolymerisiert und gebrauchsfertig.

### 3.6.4 Herstellung der Gradienten-Gele

#### Lösungen:

Sammelgellösung: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8  
0,1 % (w/v) SDS  
4 % (w/v) Polyacrylamid  
0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat  
0,1 % (v/v) TEMED in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Trenngellösung mit niedriger Acrylamidkonzentration:

375 mM Tris/HCl, pH 8,8  
0,6 % (w/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) SDS  
10 % (w/v) Polyacrylamid  
1 % (w/v) Bisacrylamid  
0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat  
0,05 % (v/v) TEMED in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Trenngellösung mit hoher Acrylamidkonzentration:

375 mM Tris/HCl, pH 8,8  
1,2 % (w/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) SDS  
19 % (w/v) Polyacrylamid  
2 % (w/v) Bisacrylamid  
0,03 % (w/v) Ammoniumpersulfat  
0,05 % (v/v) TEMED in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### Durchführung:

Für die Herstellung des 10 - 19 %igen Gradienten-Trenngels wurden die zwei Trenngellösungen mit unterschiedlich hohen Acrylamid-Konzentrationen in zwei in Verbindung stehende Säulen gefüllt. Das gleichmäßige Mischen der beiden Lösungen wurde durch einen Magnetrührer in der Kammer mit der Trenngellösung mit niedriger Acrylamidkonzentration und das langsame Abpumpen der Lösung dieser Kammer in

zehn Gelvorrichtungen (Mini-Gelsystem,  $50 \times 70 \times 1$  mm, Hoefer Scientific Instruments, California, USA) durch eine P1-Pumpe (Pharmacia, Freiburg, D) erreicht. Nach der Polymerisierung der Trenngele konnten diese mit der Sammelgellösung überschichtet und die Kämme eingesetzt werden.

### 3.6.5 Gelelektrophorese

Elektrodenpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,3  
380 mM Glycin  
0,1 % ( $^w/v$ ) SDS in  $H_2O$  bidest.

#### Durchführung:

Nach dem vorsichtigen Entfernen der Kämme wurden die Gele in die Elektrophoresekammern (Hoefer Scientific Instruments, California, USA) eingespannt und diese mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Proben und der Marker wurden mit einer 25  $\mu$ l-Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH) in die Taschen injiziert. Taschen, die nicht verwendet werden sollten, wurden mit reinem Probenpuffer beladen, um eine gleichmäßige Lauffront zu erhalten. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel und ihre Auftrennung im Trenngel erfolgten bei 80 - 210 V.

### 3.6.6 Western-Blotting

Mit dem Western-Blotting können einzelne Proteine immunologisch nachgewiesen werden, nachdem die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert worden sind (Towbin et al., 1979) und dort fixiert, aber für Antikörper zugänglich, vorliegen.

#### Elektrophoretischer Proteintransfer

Der elektrophoretische Transfer vom Polyacrylamidgel zur Nitrozellulosemembran wurde mit Hilfe des Nassblotverfahrens in Elektrophorese-Kammern der Firma Bio-Rad (München, D) durchgeführt.

**Lösungen:**

Blotpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,3  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol p.a. in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma P 3504; Sigma, Taufkirchen, D)  
3 % (w/v) TCA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

**Durchführung:**

Etwa 30 Minuten vor dem Gebrauch wurden eine Nitrozellulosemembran (Pall, Dreieich, D) und zwei Filterpapiere (Whatman 3 mm Chromatographiepapier, Maidstone, GB) auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und in Blotpuffer äquilibriert. Direkt nach der Beendigung der Gelelektrophorese wurden eine Lage Whatmanpapier, die Nitrozellulosefolie, das Trenngel und eine weitere Lage Whatmanpapier luftblasenfrei übereinander geschichtet und so in die Nassblotkammer eingespannt, dass die Membran zwischen Gel und Anode lag. Die durch einen Eisblock gekühlte Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte durch Anlegen von 350 mA für 60 Minuten bei 4 °C.

Anschließend wurde der Proteintransfer durch eine reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S kontrolliert (Salinovic und Montelaro, 1986), indem die Nitrozellulosemembran für 30 Sekunden in der Färbelösung geschwenkt wurde. Der Hintergrund wurde durch Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> entfernt.

**Immunologische Proteindetektion****Lösungen:**

TBS: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
0,9 % (w/v) NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

TBS-Tween: 0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS

Blocklösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver  
1 % (w/v) BSA in TBS-Tween

Primär-Antikörperlösung:

1 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) BSA

0,02 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Natriumazid in TBS

Primär-Antikörper:

Die TIP-Antisera, das Vicilin- und das WGA-Antiserum (siehe Kap.3.2.1) wurden mit der Primär-Antikörperlösung auf 1:1000 (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) verdünnt, während der Legumin-Antikörper (siehe Kap.3.2.1) in einer Verdünnung von 1:10.000 (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) eingesetzt wurde.

Sekundär-Antikörperlösung:

3 % (<sup>w</sup>/<sub>v</sub>) Magermilchpulver in TBS-Tween

Sekundär-Antikörper (siehe Kap.3.2.2):

Der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtete Antikörper (Sigma, Taufkirchen, D) wurde mit der Sekundär-Antikörper-Lösung 1:10.000 (<sup>v</sup>/<sub>v</sub>) verdünnt.

### **Durchführung:**

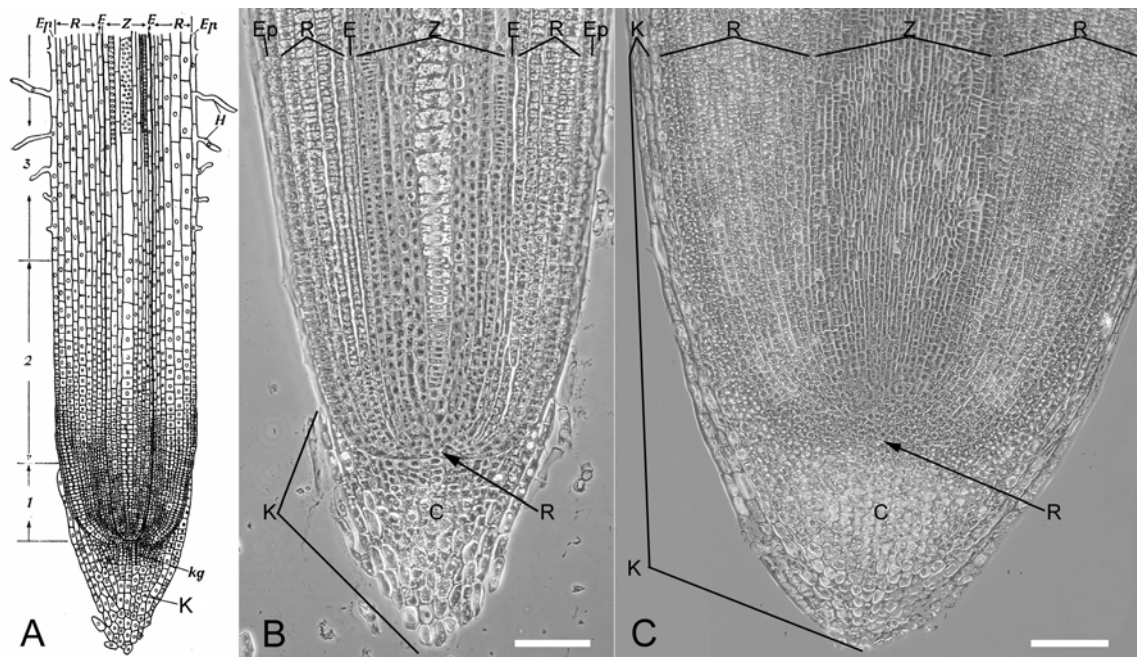
Die Transfer-Membran wurde mindestens eine Stunde in der Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Bindungskapazitäten der Membran abzusättigen. Nach gründlichem Waschen (3 × 5 min mit Waschpuffer) wurde die Membran eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde sie dreimal für zehn Minuten gewaschen und eine Stunde in der Sekundär-Antikörperlösung geschwenkt. Nach erneutem Waschen (3 × 10 min) wurde mit Hilfe eines auf Chemilumineszenz basierenden Tests ("enhanced chemiluminescence", ECL) die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase detektiert. Der ECL-Test ist sehr empfindlich und daher auch zum Nachweis geringer Proteinmengen geeignet. Die Nitrozellulosemembran wurde eine Minute mit der ECL-Lösung ("SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate", Pierce, Bonn, D) inkubiert, in Klarsichtfolie eingepackt und in Abhängigkeit von der Stärke des Signals für wenige Sekunden bis zu mehreren Stunden auf einem Fotofilm exponiert (Hyperfilm, RPN 2104, Amersham, GB). Der Fotofilm wurde eine Minute entwickelt, kurz gewässert, mehrere Minuten fixiert, erneut gewässert und getrocknet. Die Nitrozellulosemembran wurde 15 Minuten in Waschpuffer geschwenkt und nach dem Trocknen bei RT aufbewahrt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuchsubjekte

Für die Untersuchungen der Vakuolen in Wurzelspitzen wurde die Sommergerste *Hordeum vulgare* L., als Vertreter einer Monokotyledonen, und die Erbse *Pisum sativum* L., als Vertreter der Dikotyledonen, ausgewählt. Die Wurzeln wurden in den ersten 0,8 mm der Spitze untersucht (Abbildung 4 B und C). Dabei waren die Kalyptra und die meristematische Region von vorrangigem Interesse. Zum Teil wurde auch die an das Meristem angrenzende Streckungszone in die Untersuchung einbezogen.

Die beiden Wurzeln unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Die Kalyptra der Gerstenkeimwurzel liegt, wie in der schematischen Abbildung zu sehen ist, vor dem Meristem (Abbildung 4 A und B). Während bei der Erbsenkeimwurzel die Kalyptra aus der vor dem Meristem liegenden Haube und einer intakten zwei bis drei Zellreihen dicken Schicht besteht, die die Wurzel lateral bis in die Streckungszone hinein ummantelt (Abbildung 4 C).



**Abbildung 4: Versuchsubjekte**

A: Gerstenwurzel-Längsschnitt-Schema (Rauh, 1950): 1. Meristem, 2. Streckungszone und 3. Differenzierungszone.

B: Gerstenkeimwurzel-Längsschnitt (Phasenkontrastbild)

C: Erbsenkeimwurzel-Längsschnitt (Phasenkontrastbild)

C Columella; E Endodermis; Ep Epidermis; H Wurzelhaare; K Kalyptra; kg Kalyptragen; R Rinde; Z Zentralzylinder.

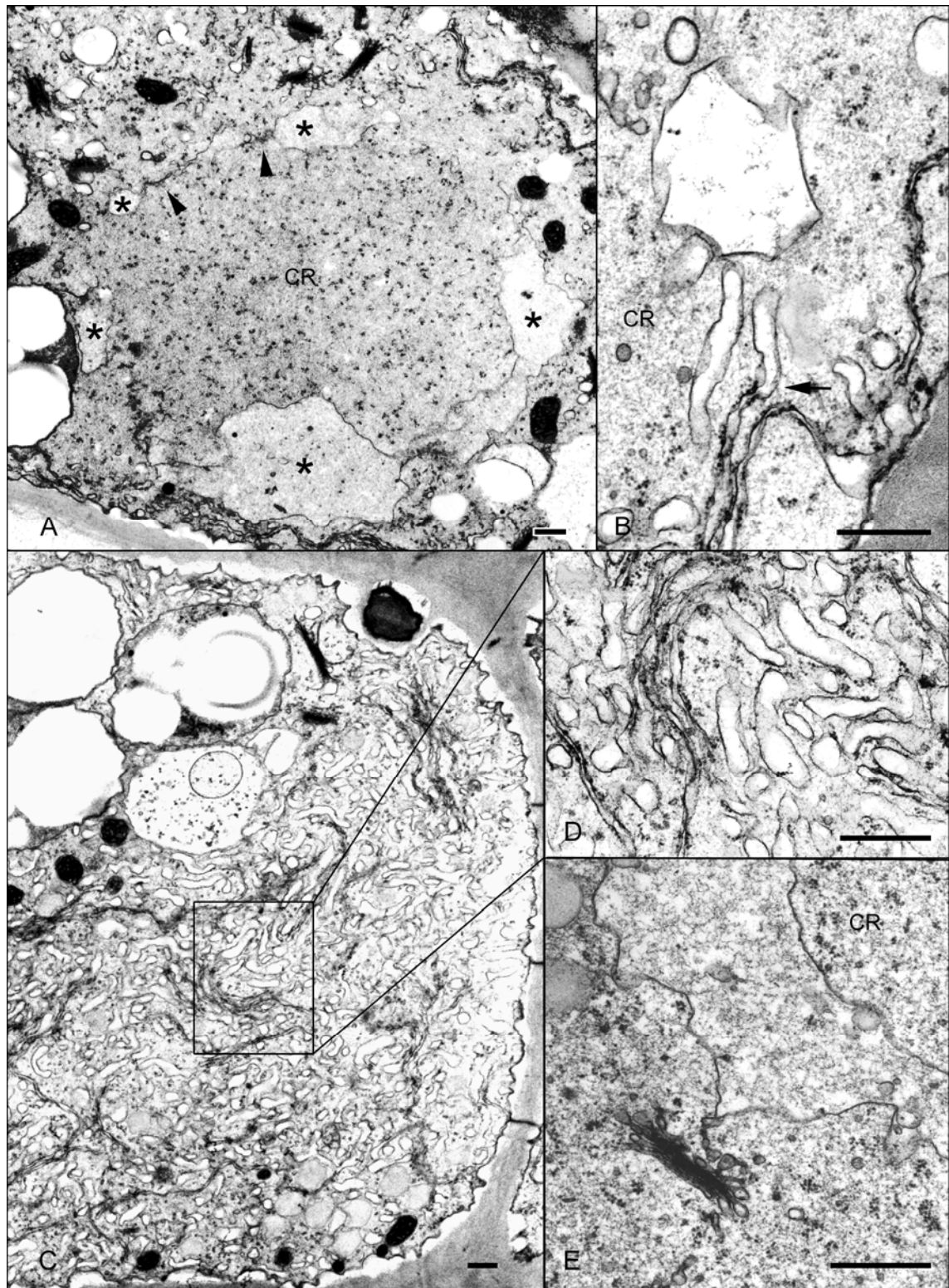
Längenstandards entsprechen 100 µm.

## **4.2 Strukturelle Untersuchung der Erbsenkeimwurzeln**

Vergleichend zu der morphologischen Untersuchung der Vakuolen in Gerstenkeimwurzeln (Olbrich, 2000), wurden die Vakuolen von Erbsenkeimwurzeln in den verschiedenen Regionen im Elektronenmikroskop betrachtet. Von besonderem Interesse waren hierbei meristematische Zellen, in denen die Vakuolen neu gebildet werden. Dabei wurden in vielen Kalyptrazellen, in denen noch keine ausdifferenzierten Vakuolen zu sehen waren, große cytoplasmatische Regionen entdeckt, die keine Organellen enthalten. Diese Regionen waren fast vollständig von zwei Membranen umschlossen, die eng aneinander lagen (Abbildung 5 A Pfeilspitzen) oder weiter voneinander entfernt einen im Elektronenmikroskop hell erscheinenden Bereich abgrenzten (Abbildung 5 A Sterne).

In der Region in der sich die Membranstrukturen ausbilden, die die cytoplasmatische Region umschließen, sind Ansammlungen von glattem und rauhem ER zu beobachten (Abbildung 5 B). Im Gegensatz dazu bestehen die ER-Ansammlungen im äußeren Bereich der Zellen ausschließlich aus rauhem ER (Abbildung 5 A). Deshalb kann der in Abbildung 5 C und D dargestellte Bereich als Tangentialschnitt durch die Membranstrukturen, die eine organellenfreie Region umschließen, identifiziert werden. In Abbildung 5 E ist eine Kette von Vesikeln zwischen dem TGN und der Membran erkennbar, die die cytoplasmatische Region umhüllt.





### Abbildung 5: Vakuolenbiogenese in Kalyptrazellen von Erbsenkeimwurzeln

A: Radialer Schnitt durch eine organellenfreie cytoplasmatische Region (CR), größtenteils umschlossen von zwei Membranen, die eng aneinander (Pfeilspitzen) oder weiter voneinander entfernt liegen (Sterne).

B: Übergang von rauhem in glattes ER (Pfeil) in einer Region, in der sich die Membranstrukturen ausbilden, die die cytoplasmatische Region umschließen.

C und D: Tangential angeschnittene Ansammlung von glattem und rauhem ER.

E: Zwischen dem TGN und der Membran, die die cytoplasmatische Region umschließt, liegt eine Kette von Vesikeln.

Längenstandards entsprechen 500 nm.

### 4.3 Lokalisierung der Proteinspeichervakuolen

#### Gerstenkeimwurzeln

Die über ihren Speicherprotein-Inhalt definierten Proteinspeichervakuolen wurden bei den Gerstenwurzeln durch den immunologischen Nachweis von Gerstenlektin identifiziert. Da die Aminosäuresequenzen des Gersten- und Weizenlektins hoch konserviert und die beiden Proteine immunologisch nicht zu unterscheiden sind (Lerner und Raikhel, 1989), konnte das Gerstenlektin mit einem gegen *Triticum aestivum*-Lektin gerichtetem Antiserum nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.2.1).

Durch die Immunofluoreszenz-Markierung des Gerstenlektins konnte gezeigt werden, dass alle Zellen der Kalyptra, die Epidermis und die zwei bis drei äußersten Zellreihen der Wurzelrinde Lektin enthalten (Abbildung 6 A bis C).

Im Elektronenmikroskop wird sichtbar, dass die Vakuolen der Kalyptrazellen elektronendichte und damit dunkel erscheinende Proteinaggregate enthalten (Abbildung 6 D). In diesen kann durch die Immunogold-Markierung Lektin nachgewiesen werden (Abbildung 6 E). Die in der Nähe des Ruhezentrums beschriebenen frühen Vakuolenbildungsstadien (Abbildung 6 F; Olbrich, 2000) und die Vakuolen der äußeren Rindenzellen, die weiter entfernt vom Ruhezentrum liegen, enthalten ebenfalls Gerstenlektin (Abbildung 6 G).

#### Abbildung 6 (S. 52): Gerstenlektin-Immunolokalisierung in Gerstenkeimwurzeln

A - C: Lektin-Immunofluoreszenz-Markierung

A: Längsschnitt; B: Querschnitt durch die Streckungszone; C: Querschnitt durch die Kalyptra.

Der Balken in Längsschnitt (A) markiert die ungefähre Region, der der Querschnitt durch die Kalyptra (C) anhand des Durchmessers zugeordnet werden kann.

D: Kalyptrazelle

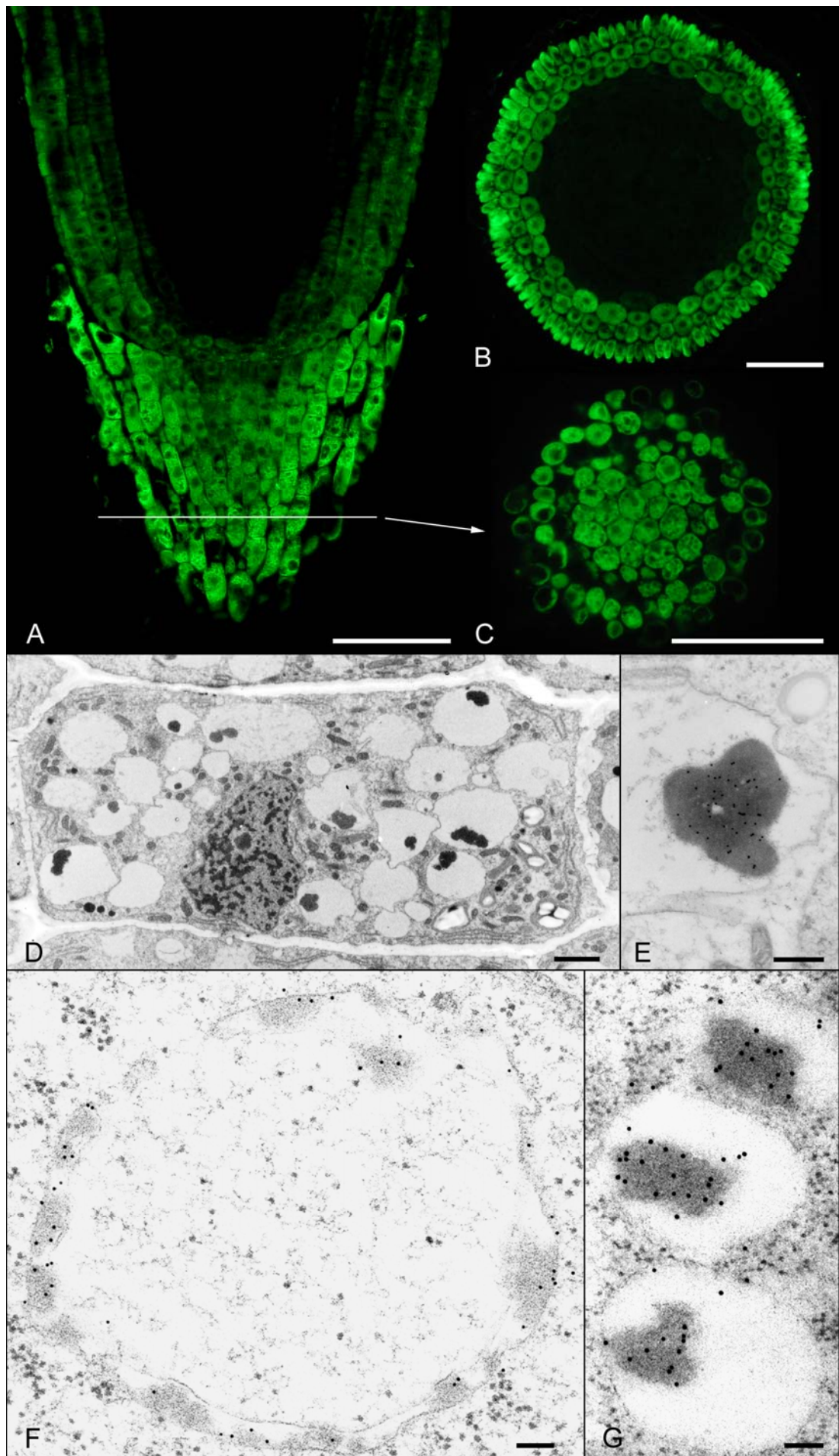
E - G: Lektin-Immunogold-Markierung

E: Markiertes Proteinaggregat in der Vakuole einer Kalyptrazelle.

F: Frühes Proteinspeichervakuolen-Bildungsstadium in der Nähe des Ruhezentrums mit markierten Proteinaggregaten (Olbrich, 2000).

G: Markierte Proteinspeichervakuolen einer äußeren Rindenzelle.

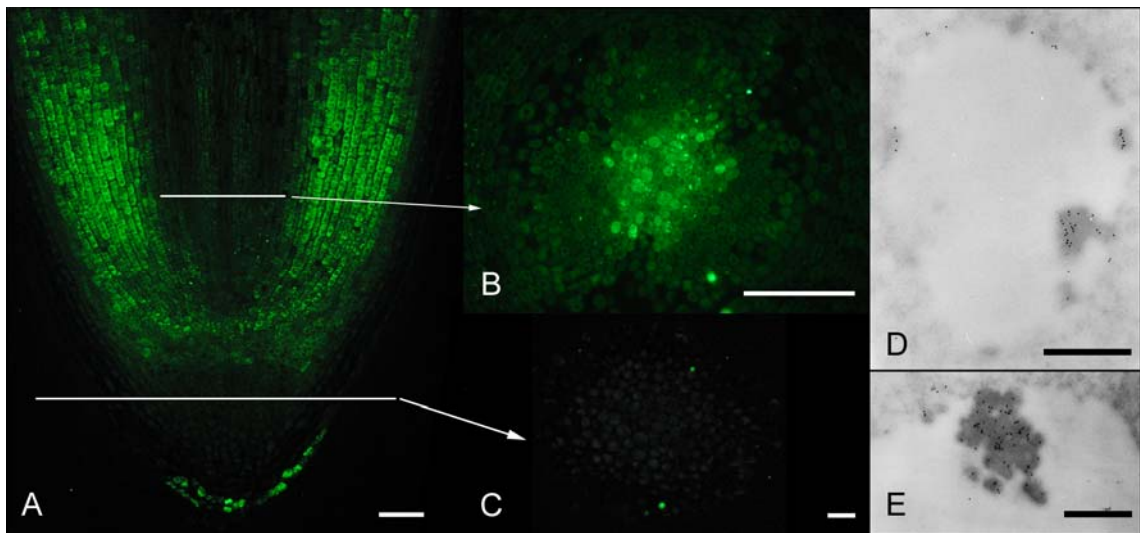
Die Längenstandards der Fluoreszenz-Bilder entsprechen 100 µm. Der Standard in D entspricht 2 µm und die Standards von E bis G entsprechen 100 nm.



## Erbsenkeimwurzeln

Zur Identifikation der Proteinspeichervakuolen in Erbsenwurzeln wurde ein Antiserum gegen das Erbsenspeicherprotein Vicilin verwendet (siehe Kap. 3.2.1).

Die Immunofluoreszenz-Markierung ergab, dass das Rindenparenchym und einzelne Bereiche des sich ausbildenden Zentralzylinders Vicilin enthalten (Abbildung 7 A). Abbildung 7 B zeigt einen Querschnitt durch den Zentralbereich der Keimwurzel bei höherer Vergrößerung. Da für diese Aufnahme ein Objektiv mit höherer numerischer Apertur verwendet wurde, ist das Fluoreszenzsignal in dem markierten Bereich intensiver als im Längsschnitt zu sehen. Die an das Ruhezentrum und die Rinde angrenzenden Zellen der Kalyptra zeigen ebenfalls ein Fluoreszenzsignal, das jedoch deutlich schwächer ist. Die übrige Kalyptra ist mit Ausnahme der im Längsschnitt stark fluoreszierenden äußersten Zellen der Kalyptra nicht markiert (Abbildung 7 A und C). Bei diesen Zellen handelt es sich jedoch wahrscheinlich um abgestorbene Zellen. Die Immunogold-Markierung zeigte, dass das in den Rindenzellen nachgewiesene Vicilin in sichtbaren Proteinaggregaten in den Vakuolen vorliegt (Abbildung 7 D und E).



**Abbildung 7: Vicilin-Immunolokalisierung in Erbsenkeimwurzeln**

A - C: Vicilin-Immunofluoreszenz-Markierung

A: Längsschnitt; B: Querschnitt durch den sich entwickelnden Zentralzylinder der Streckungszone; C: Querschnitt durch die Kalyptra.

Die Balken in Längsschnitt (A) markieren die ungefähren Regionen, der der Teilbereich des Querschnittes B und der Querschnitte C anhand des Durchmessers zugeordnet werden können.

D und E: Vicilin-Immunogold-Markierung der Proteinaggregate in Vakuolen der Rindenzellen.

Die Längenstandards der Fluoreszenz-Bilder entsprechen 100  $\mu\text{m}$ , während die Standards der elektronenmikroskopischen Aufnahmen 500 nm entsprechen.



#### **4.4 $\alpha$ -TIP-Lokalisierung**

Für die Lokalisierung des als Markerprotein für den Tonoplast der Proteinspeichervakuolen angesehenen Aquaporins  $\alpha$ -TIP (siehe Kap. 2.1) wurden zwei verschiedene Antiseren verwendet: das gegen das aus *Phaseolus vulgaris* L. aufgereinigte  $\alpha$ -TIP-Protein und ein gegen ein für  $\alpha$ -TIP spezifisches Peptid der C-terminalen  $\alpha$ -TIP-Aminosäuresequenz (siehe Kap.3.2.1).

##### **Gerstenkeimwurzeln**

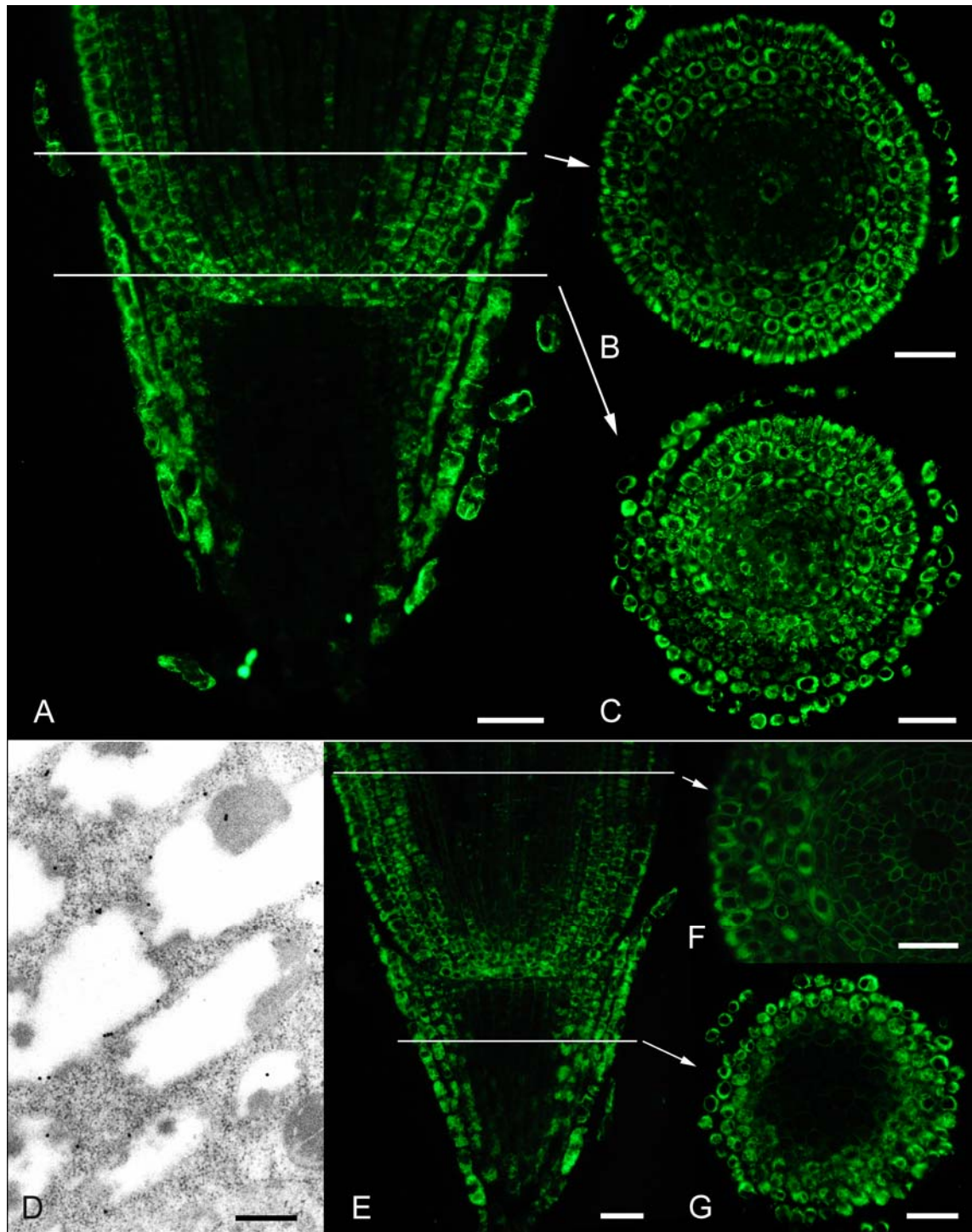
Die Immunofluoreszenz-Markierungen mit den zwei verschiedenen Antiseren zeigen das gleiche Ergebnis. Die äußeren Zellen der Kalyptra enthalten  $\alpha$ -TIP, während die Columella nicht markiert ist (Abbildung 8 A, E und G). Die Epidermis und die Rinde zeigen ebenfalls ein eindeutiges Fluoreszenzsignal (Abbildung 8 A, B, C, E und F). Im Zentralbereich weisen nur einzelne Zellen ein schwaches Signal auf (Abbildung 8 A, B und E).

Im Elektronenmikroskop war die Immunogold-Markierung ebenso nur in den äußeren Zellen der Kalyptra (Abbildung 8 D) und in den Rindenzellen zu beobachten.

##### **Erbsenkeimwurzeln**

Die beiden  $\alpha$ -TIP-Antiseren zeigen auch bei den Erbsenkeimwurzeln ein identisches  $\alpha$ -TIP-Verteilungsmuster. Die äußeren Zellen der Kalyptra sind auch hier im Gegensatz zu den Columellazellen markiert. Ebenfalls sind die Epidermis, die Rinde und einzelne Bereiche des sich entwickelnden Zentralzylinders markiert.

Die Immunogold-Markierung bestätigte dieses Verteilungsmuster. Interessanterweise zeigten die Membranen, die in der Kalyptra eine cytoplasmatische Region einschließen, die keine Organellen enthält, eine besonders hohe Markierungsdichte (Abbildung 9 D).



**Abbildung 8:  $\alpha$ -TIP-Immunolokalisierung in Gerstenkeimwurzeln**

A - C: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum.

A: Längsschnitt; B und C: Querschnitt durch die meristematische Region.

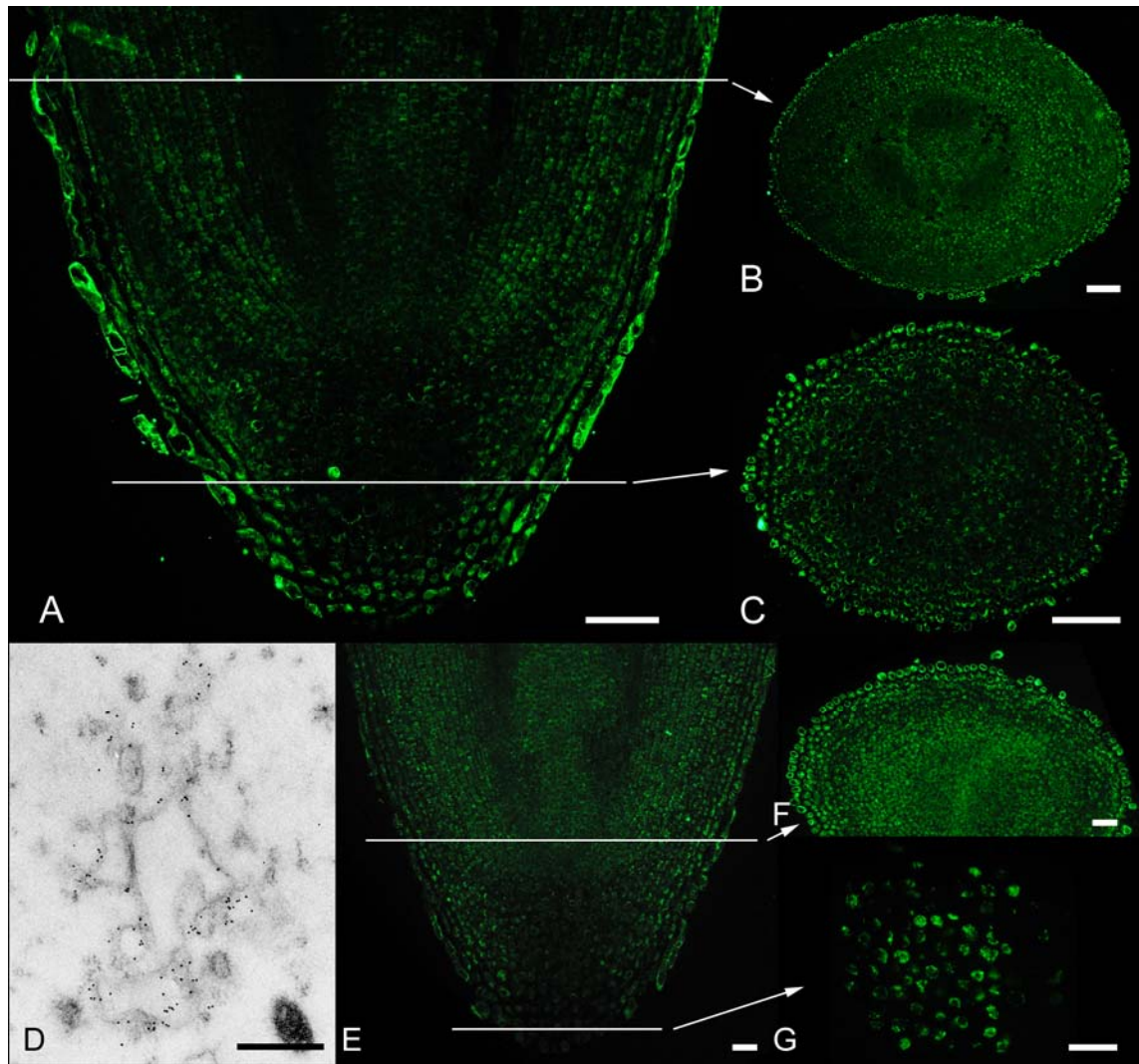
D: Immunogold-Markierung einer äußeren Kalyptrazelle mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum.

E - G: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Protein-Antiserum.

E: Längsschnitt; F: Querschnitt durch die Streckungszone; G: Querschnitt durch die Kalyptra.

Die Balken in den Längsschnitten (A und E) markieren die ungefähren Regionen, der die Querschnitte B, C, F und G anhand des Durchmessers zugeordnet werden können.

Die Längenstandards der Fluoreszenz-Bilder entsprechen 50  $\mu$ m, während der Standard in D 300 nm entspricht.



### Abbildung 9: $\alpha$ -TIP-Immunolokalisierung in Erbsenkeimwurzeln

A - C: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum.

A: Längsschnitt; B: Querschnitt durch die Streckungszone; C: Querschnitt durch die Kalyptra.

D: Immunogold-Markierung des Membransystems einer Kalyptrazelle, das eine organellenfreie, cytoplasmatische Region umgibt, mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum.

E - G: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Protein-Antiserum.

E: Längsschnitt; F: Querschnitt durch die meristematische Region; G: Querschnitt durch die Kalyptra.

Die Balken in den Längsschnitten (A und E) markieren die ungefähren Regionen, der die Querschnitte B, C, F und G anhand des Durchmessers zugeordnet werden können.

Die Längenstandards der Fluoreszenz-Bilder entsprechen 50  $\mu$ m, während der Standard in D 500 nm entspricht.

#### 4.5 $\gamma$ -TIP-Lokalisierung

Das Aquaporin  $\gamma$ -TIP wird als Markerprotein für den Tonoplast der lytischen Vakuolen angesehen (siehe Kap. 2.1). Für die Immunolokalisierung dieses Proteins wurden zwei verschiedene Antiseren gegen zwei für  $\gamma$ -TIP spezifische Peptide verwendet:  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima und  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh (siehe Kap. 3.2.1).

#### Gerstenkeimwurzeln

Beide verwendeten Antiseren zeigten bei der Immunofluoreszenz-Markierung das gleiche Signal-Verteilungsmuster (Abbildung 10 A, B, C, E und G). In der gesamten Kalyptra wurde  $\gamma$ -TIP nachgewiesen. Das Fluoreszenzsignal war jedoch in den äußeren Zellen intensiver (Abbildung 10 A, C und G).

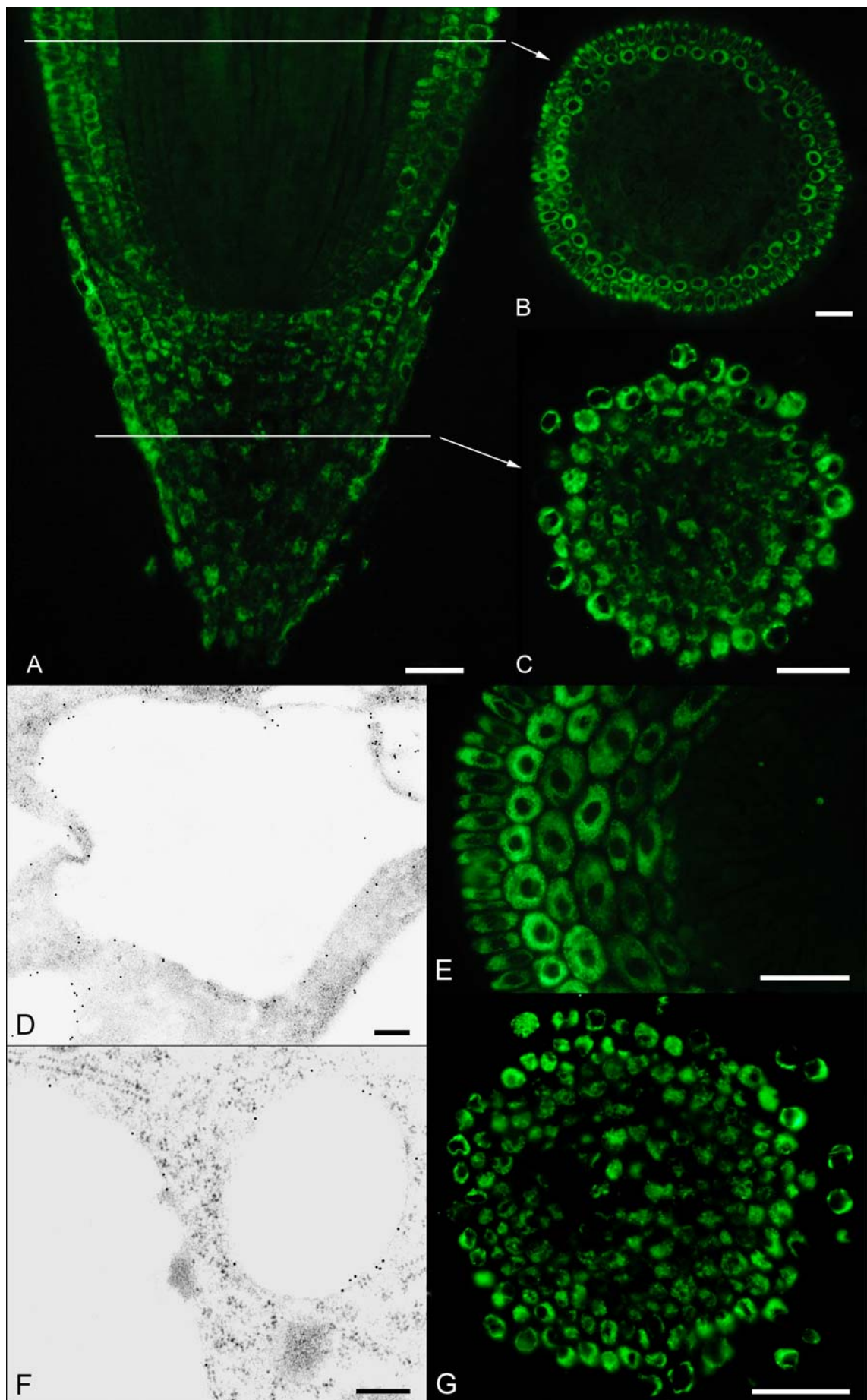
Die Epidermis und die Rinde waren im Gegensatz zu dem Zentralzylinder markiert. Dabei ist auffällig, dass das Fluoreszenzsignal in der äußersten Zellreihe der Rinde deutlich heller war als in der Epidermis, und dass die benachbarten Rindenzellen in Richtung des sich entwickelnden Zentralzylinders immer schwächer fluoreszierten (Abbildung 10 A, B und E).

Im Elektronenmikroskop war an den Tonoplasten der Vakuolen der Streckungszone, in denen keine Proteinaggregate zu sehen waren, die größte Markierungsdichte der  $\gamma$ -TIP-Markierung zu beobachten (Abbildung 10 D). Die Proteinspeichervakuolen der äußeren Kalyptrazellen waren zwar schwach, aber eindeutig markiert (Abbildung 10 F), während im Innern der Kalyptra, aufgrund der geringen Goldpartikelanzahl, keine eindeutige Markierung erkennbar war (Daten nicht gezeigt).

#### Abbildung 10 (S. 58): $\gamma$ -TIP-Immunolokalisierung in Gerstenkeimwurzeln

A - C: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima  
A: Längsschnitt; B: Querschnitt durch die Streckungszone; C: Querschnitt durch die Kalyptra.  
Die Balken in Längsschnitt (A) markieren die ungefähren Regionen, der die Querschnitte B und C anhand ihres Durchmessers zugeordnet werden können.  
D: Immunogold-Markierung einer Vakuole in der Rinde der Streckungszone mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima  
F: Immunogoldmarkierung der Proteinspeichervakuolen der Kalyptra mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima  
E, G: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh.  
E: Querschnitt durch die Streckungszone; G: Querschnitt durch die Kalyptra.  
Die Längenstandards der Fluoreszenz-Bilder entsprechen 50  $\mu$ m, während die Längenstandards der elektronenmikroskopischen Aufnahmen 200 nm entsprechen.

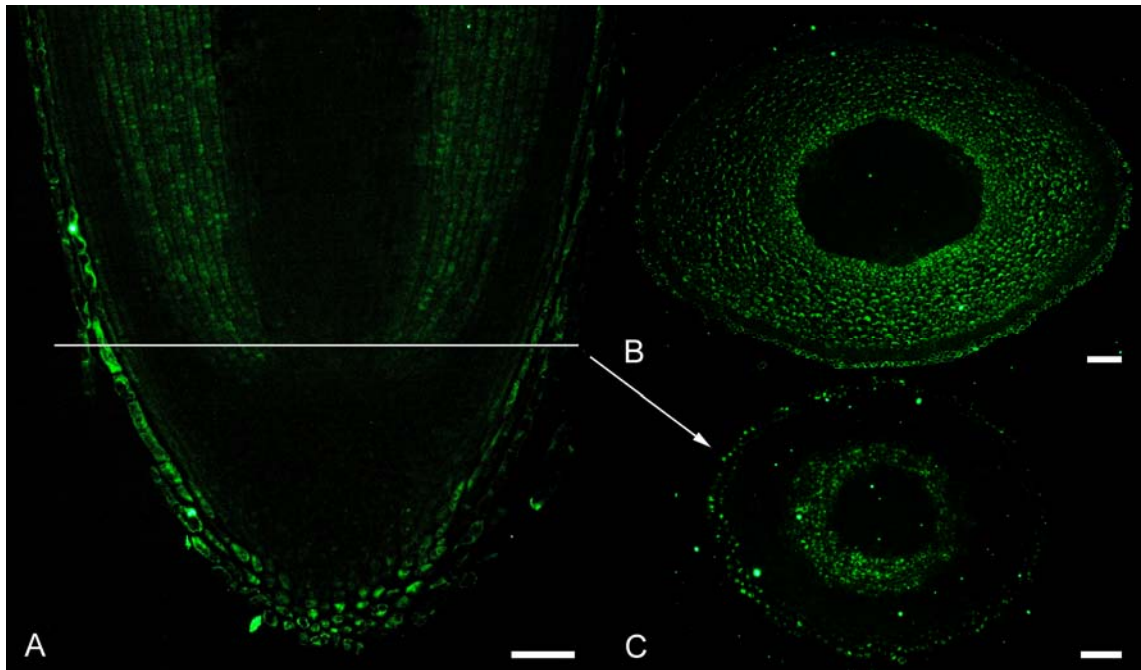




### Erbsenkeimwurzeln

Die äußeren Zellen der Kalyptra, die die Erbsenkeimwurzel von der vordersten Spitze bis in die Streckungszone ummanteln, zeigten bei der Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima ein intensives Signal. Das Ruhezentrum, die Epidermis und der Zentralzylinder waren nicht markiert, während in den Zellen der Rinde  $\gamma$ -TIP nachweisbar war (Abbildung 11 A, B und C).

Die Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh zeigte nur extrem schwache Fluoreszenzsignale (Daten nicht gezeigt). Diese waren jedoch in den gleichen Regionen der Erbsenwurzel zu beobachten, wie bei der Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima (Abbildung 11 A - C).



#### Abbildung 11: $\gamma$ -TIP-Immunolokalisierung in Erbsenkeimwurzeln

A - C: Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima

A: Längsschnitt; B: Querschnitt durch die Streckungszone; C: Querschnitt durch das Meristem.

Der Balken in Längsschnitt (A) markiert die ungefähre Region, der der Querschnitt C anhand seines Durchmessers zugeordnet werden kann.

Die Längenstandards entsprechen 100  $\mu$ m.

## 4.6 $\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Immunogoldmarkierung

### Gerstenkeimwurzeln

Die Vakuolen der äußeren Kalyptrazellen zeigten am Tonoplast größtenteils sowohl die  $\alpha$ -TIP, als auch die  $\gamma$ -TIP-Markierung (Abbildung 12 B und E). Nur sehr wenige kleine Vakuolen waren zu sehen, die ausschließlich die  $\alpha$ -TIP-Markierung tragen (Abbildung 12 E, PSV\*), während keine Vakuolen identifiziert werden konnten, die eine reine  $\gamma$ -TIP-Markierung am Tonoplast aufweisen.

Die Zellen in unmittelbarer Nähe zum Ruhezentrum zeichneten sich durch eine eindeutige  $\alpha$ -TIP-Markierung der Tonoplasten aus (Abbildung 12 A). Im Gegensatz dazu waren die vorliegenden 5 nm Goldpartikel der  $\gamma$ -TIP-Markierung größtenteils unspezifisch über die ganze Zelle verteilt (Abbildung 12 A, Pfeilspitzen). Die Tonoplasten der weiter vom Ruhezentrum entfernten Rindenzellen hingegen trugen durchgehend beide Markierungen (Abbildung 12 D).

### Abbildung 12 (S. 61): $\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Immunogold-Markierung in Gerstenkeimwurzeln

C: Lektin-Immunofluoreszenz-Markierung eines Gerstenkeimwurzel-Längsschnittes - Die Rechtecke zeigen, aus welchen Regionen der Gerstenkeimwurzel die Vakuolen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen A, B, D und E stammen.

A, B, D, E:  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP-Immunogold-Markierung:  $\alpha$ -TIP = 15 nm Goldpartikel;  $\gamma$ -TIP = 5 nm Goldpartikel = Pfeilspitzen; PSV = Proteinspeichervakuole; PSV\* = ausschließlich  $\alpha$ -TIP-markierte PSV in E

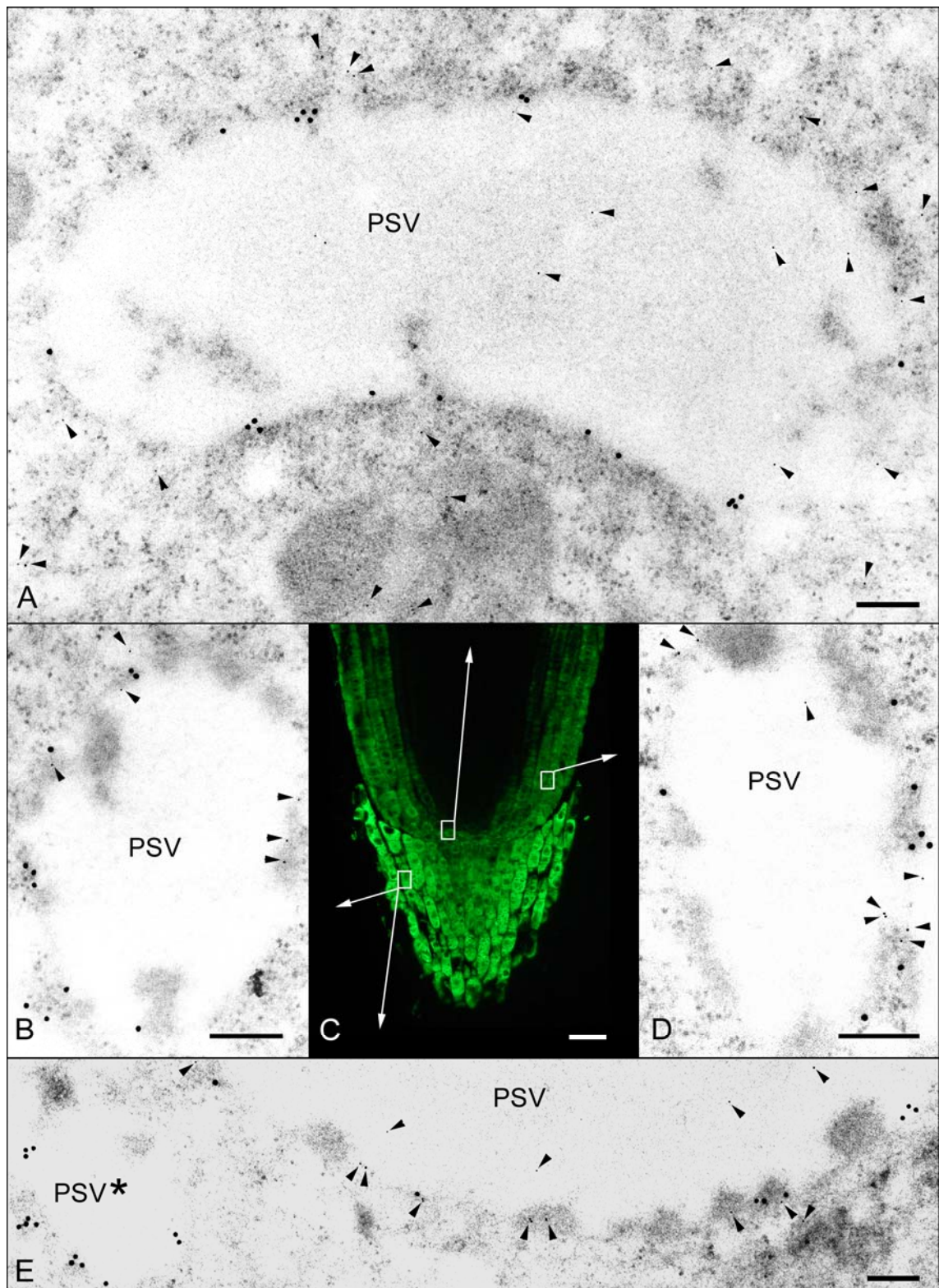
A: Proteinspeichervakuole einer sehr nah an der Ruhezone gelegenen Zelle

B, E: Proteinspeichervakuolen der äußeren Kalyptrazellen.

D: Proteinspeichervakuole einer Rindenzelle.

Der Längenstandard in C entspricht 50  $\mu$ m und die Längenstandards der elektronenmikroskopischen Aufnahmen entsprechen 200 nm.





### **Erbsenkeimwurzeln**

Die in den Kalyptrazellen beobachteten Membranstrukturen, die die cytoplasmatischen Regionen einschließen, die keine Organellen enthalten, zeigen eine eindeutige  $\alpha$ -TIP-Markierung (Abbildung 13 A und B). Die Dichte der 5 nm-Goldpartikel auf diesen Membranen ist sehr hoch, während die 15 nm-Goldpartikel der  $\gamma$ -TIP-Markierung an diesen Membranen nicht zu sehen sind. Die ausdifferenzierten Proteinspeichervakuolen der Kalyptrazellen hingegen weisen auf ihren Tonoplasten auch die größeren Goldpartikel der  $\gamma$ -TIP-Markierung auf (Abbildung 13 C, Pfeile).

In den Rindenzellen der meristematischen Region sind an den Tonoplasten der Proteinspeichervakuolen die Goldpartikel der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP-Markierung sichtbar (Abbildung 13 D).

#### **Abbildung 13 (S. 63): $\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Immunogold-Markierung in Erbsenkeimwurzeln**

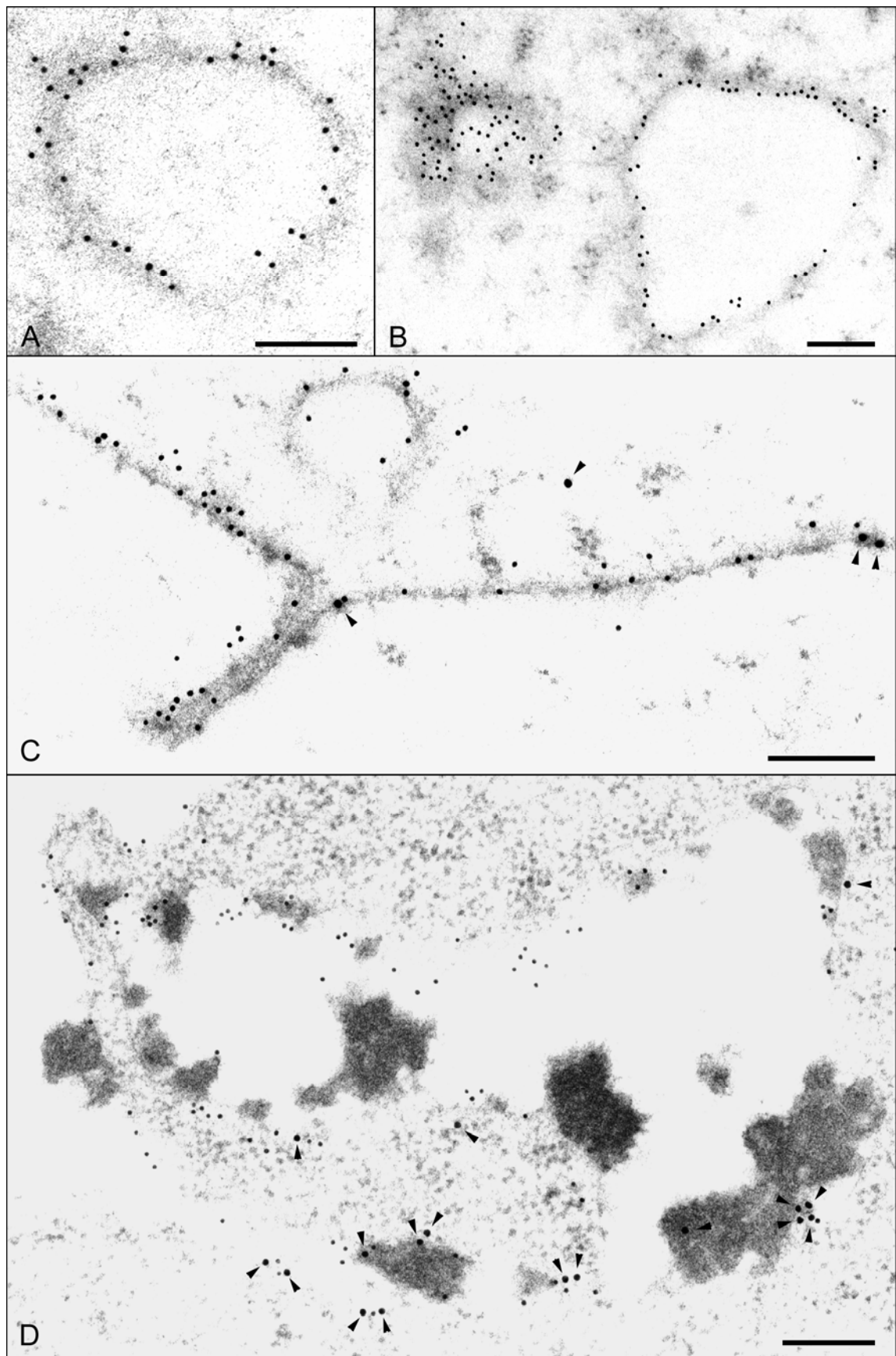
A - D:  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP-Immunogold-Markierung:  $\alpha$ -TIP = 10 nm Goldpartikel;  $\gamma$ -TIP = 15 nm Goldpartikel = Pfeilspitzen; PSV = Proteinspeichervakuole

A, B: Sehr kleine Membranstrukturen, die in einer Kalyptrazelle eine cytoplasmatische Region umschließen, die keine Organellen enthält.

C: Proteinspeichervakuole einer Kalyptrazelle.

D: Proteinspeichervakuolen einer Rindenzelle der meristematischen Region.

Die Längenstandards entsprechen 200 nm.



#### 4.7 Western-Blot

Zusätzlich zur Immunolokalisierung im Fluoreszenz- und Elektronenmikroskop wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die durch Zentrifugation fraktionierten Proteine der äußersten Wurzelspitzen (1 - 2 mm) von Gersten- und Erbsenkeimwurzeln verwendet (1. Sediment von 1.000 bis 12.000 g = 1 - 12 und 2. Sediment von 12.000 bis 128.000 g = 12 - 128). Als Kontrollen dienten eine aus Erbsenkotyledonen isolierte „proteinbody“-Fraktion (PB-Fraktion) und eine Membranfraktion aus Gerstenblättern.

In der äußersten Spitze der beiden Keimwurzeln konnte sowohl  $\alpha$ - als auch  $\gamma$ -TIP nachgewiesen werden, während in der PB-Fraktion der Erbsenkotyledonen ausschließlich  $\alpha$ -TIP und in der Gerstenblatt-Membranfraktion nur  $\gamma$ -TIP enthalten ist (Abbildung 14 A). Zusätzlich konnte mit diesen Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass das verwendete  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh und das  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima auch mit den Proteinen der Gersten und Erbsenkeimwurzel spezifisch reagieren (Abbildung 14 A). Dies konnte auch für das  $\alpha$ -TIP-Protein-Antiserum und für das  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Jauh bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

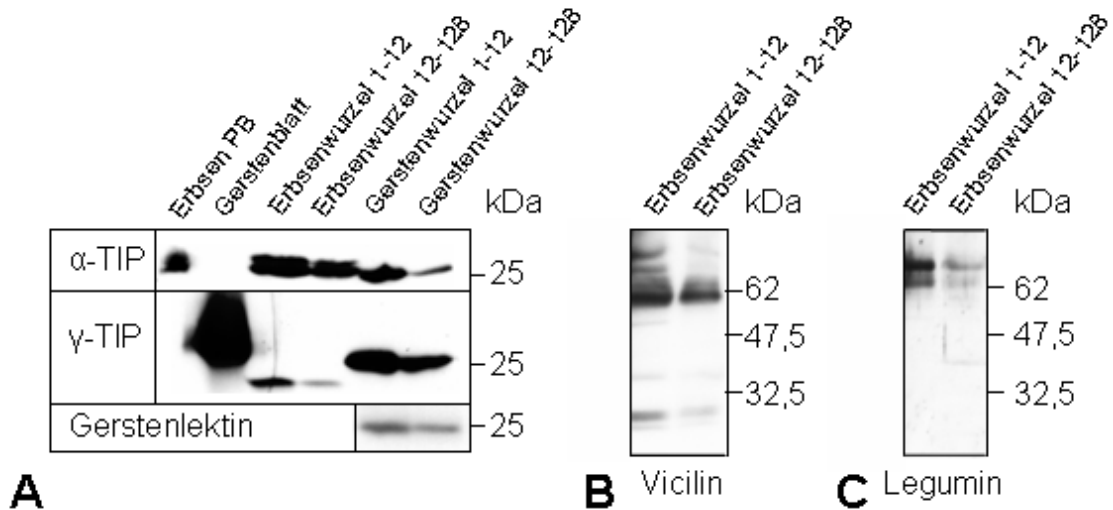
Zusätzlich wurde in den Membranfraktionen der Gerstenkeimwurzeln das Gerstenlektin mit einer Größe von ca. 23 kDa nachgewiesen (Abbildung 14 A). Dies entspricht der Größe des unprozessierten Gerstenlektins (Lerner und Raikhel, 1989).

Im Western-Blot der Erbsenkeimwurzel-Membranfraktionen konnten mehrere Vicilin-Banden nachgewiesen werden (Abbildung 14 B). Die Banden bei 75 und 70 kDa entsprechen zwei der von Chrispeels und Mitarbeitern beschriebenen unprozessierten Vertretern der Vicilin-Proteinfamilie (1982 a und b). Die sehr schwache Bande bei ca. 50 kDa kann ebenfalls einem unprozessiertem Vicilin zugeordnet werden. Die Banden bei 34, 30 und 25 kDa hingegen entsprechen den Banden, die auch in den Erbsenkotyledonen nach der Prozessierung der Viciline vorliegen (Chrispeels et al., 1982 a und b). Das intensivste Signal dieses Western-Blottes bei ca. 60 kDa ist hingegen bei den Erbsenkotyledonen nicht beschrieben.

Die Legumine lagen in den Erbsenkeimwurzeln nur als unprozessierte Prolegumine von ca. 60 und 62 kDa vor (Abbildung 14 C; Chrispeels et al., 1982 a und b).

Alle untersuchten Proteine sind sowohl bei der Gersten- als auch bei der Erbsenkeimwurzel in der ersten Membranfraktion (1.000 - 12.000 g) in höherer

Konzentration enthalten als in der zweiten Membranfraktion (12.000 bis 128.000 g) (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Western-Blots**

A:  $\alpha$ -TIP-Detektion mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum,  $\gamma$ -TIP-Detektion mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima und Gerstenlektin-Detektion mit dem WGA-Antiserum.

B: Vicilin-Detektion

C: Legumin-Detektion

Erbsen PB = „Proteinbody“-Fraktion aus Erbsenkotyledonen (jeweils 15  $\mu$ g Protein); Gerstenblatt

= Membran-Fraktion von Gerstenblättern (jeweils 30  $\mu$ g Protein); Erbsenwurzel 1 - 12 = 1. Membran-Fraktion (1.000 - 12.000 g) von Erbsenkeimwurzeln (jeweils 60  $\mu$ g Protein); Erbsenwurzel 12 - 128 = 2. Membran-Fraktion (12.000 - 128.000 g) von Erbsenkeimwurzeln (jeweils 60  $\mu$ g Protein);

Gerstenwurzel 1 - 12 = 1. Membran-Fraktion (1.000 - 12.000 g) von Gerstenkeimwurzeln (jeweils 60  $\mu$ g Protein); Gerstenwurzel 12 - 128 = 2. Membran-Fraktion (12.000 - 128.000 g) von Gerstenkeimwurzeln (jeweils 60  $\mu$ g Protein)

Die Proteine wurden für die Western-Blots in A im 14 %igen SDS-PAGE und für die Western-Blots in B und C im 10 - 19 %igen Gradientengel aufgetrennt.

#### 4.8 V-ATPase-Lokalisierung

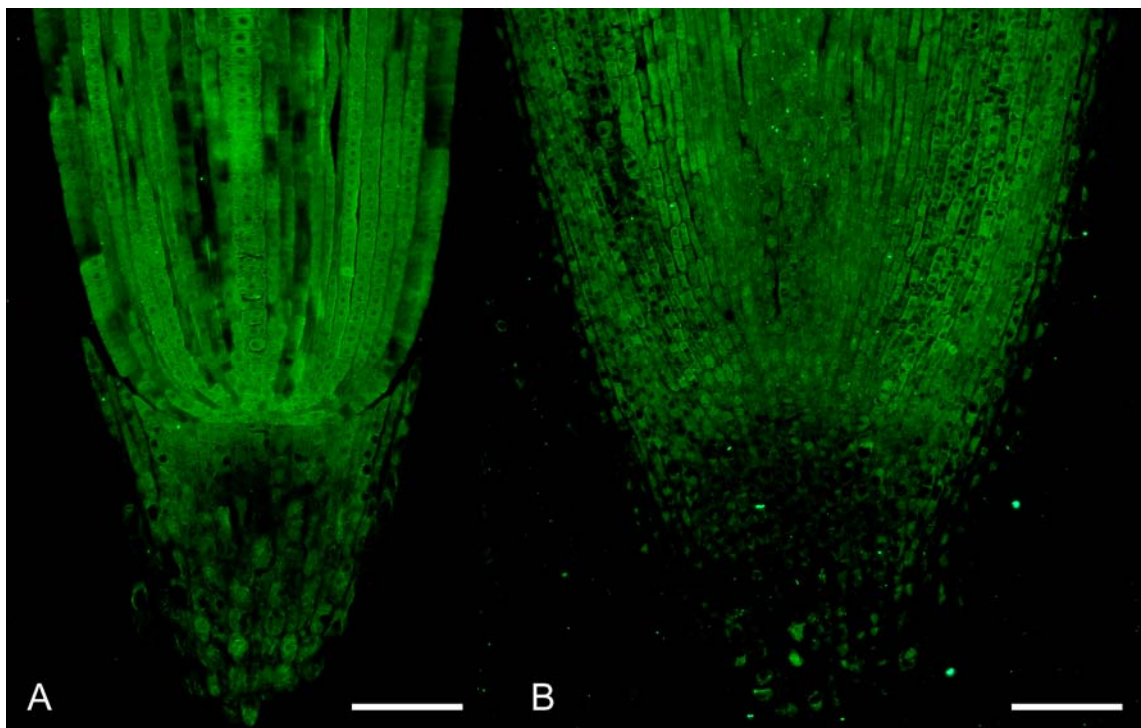
Das überraschende Ergebnis, dass in vielen Zellen des sich entwickelnden Zentralzylinders der meristematischen Region weder  $\alpha$ - noch  $\gamma$ -TIP nachweisbar waren, führte zu der Frage, ob die gewählte Fixierung eventuell gerade die Membranen dieser im innern gelegenen Bereiche nicht ausreichend fixiert. Dies könnte während der folgenden Behandlungen der Wurzeln (Entwässerung, Einbettung und Immunfluoreszenz-Markierung) in diesen Bereichen zu einem Auswaschen der Proteine führen und so den immunologischen Nachweis verhindern. Als Kontrolle wurde deshalb eine Immunfluoreszenz-Markierung eines Tonoplasten-Membranproteins, der vakuolären ATPase (V-ATPase), durchgeführt. Verwendet wurde ein gegen die A-Untereinheit, der in das Cytosol ragenden  $V_1$ -Einheit der V-ATPase, gerichtetes Antiserum (siehe Kap. 3.2.1).



Die Immunofluoreszenz-Markierung beider Keimwurzeln zeigte, dass in allen Zellreihen der meristematischen Region die V-ATPase nachweisbar war (Abbildung 15 A und B). Bei der Gerstenkeimwurzel fallen jedoch in einzelnen Zellreihen Bereiche von der Größe mehrerer in Folge liegender Zellen auf, die im Gegensatz zu der restlichen Zellreihe das Fluoreszenzsignal nicht oder nur schwach zeigen (Abbildung 15 A). Hierbei handelt es sich jedoch wahrscheinlich um im Bereich der Zellwand angeschnittene Zellen.

Bei der Erbsenwurzel ist das Signal im Ruhezentrum und in der Columella sehr viel schwächer ausgeprägt als in der meristematischen Region.

Betrachtet man die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der einzelnen Zellen, fällt auf, dass neben dem typischen vakuolären Signal das gesamte Cytoplasma fluoresziert.



**Abbildung 15: V-ATPase-Lokalisierung**

A: V-ATPase-Immunofluoreszenz-Markierung der Gerstenkeimwurzel: Längsschnitt

B: V-ATPase-Immunofluoreszenz-Markierung der Erbsenkeimwurzel Längsschnitt

Die Längenstandards entsprechen 100 µm.

#### **4.9 Wurzelspitzen der zehn Tage alten Gersten und Erbsen**

Alle vorhergehenden Untersuchungen wurden an Wurzelspitzen von drei Tage alten Keimlingen durchgeführt. Um zu kontrollieren, ob ausschließlich die Keimwurzeln Proteinspeichervakuolen besitzen, wurden ebenfalls Wurzeln von zehn Tage alten Pflanzen, die im Gewächshaus in Erde angezogen wurden, untersucht. Nach dieser Zeit haben die Gerstenpflanzen 8 - 13 cm lange Blätter ausgebildet. Ihre Wurzeln (i. d. R. sechs Stück) sind in diesem Stadium zwischen 10 und 16 cm lang. Die jungen Erbsenpflanzen hingegen haben zu diesem Zeitpunkt eine Höhe von ca. 7 cm erreicht. Ihre Hauptwurzeln besitzen viele Lateralwurzeln, während die Spitzen der Hauptwurzeln zum Teil bräunlich verfärbt sind und zu verkümmern scheinen. Aus diesem Grund wurden bei den zehn Tage alten Erbsenpflanzen ausschließlich die Spitzen der Sekundärwurzeln untersucht.

##### **Gerstenwurzeln**

Vergleicht man die Gerstenlektin-Immunofluoreszenz-Markierungen von den Wurzeln von zehn Tage alten Gerstenpflanzen mit den Gerstenkeimwurzeln, so sieht man das gleiche Verteilungsmuster innerhalb der Wurzeln: Die Kalyptra, die Epidermis und die äußeren Rindenzellreihen sind vollständig markiert, während in dem sich entwickelnden Zentralzylinder kein Gerstenlektin nachgewiesen werden kann (Abbildung 16 A und Abbildung 6 A - C).

Die  $\alpha$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung der älteren Gerstenwurzeln zeigt ein spezifisches Leuchten der Tonoplasten in den Zellen der Ruhezone, der Epidermis und der an diese angrenzenden Rindenzellen (Abbildung 16 B). Ein extrem schwaches Signal ist auch in einzelnen Zellen des Zentralbereichs und der Kalyptra zu beobachten. Dieses Ergebnis unterscheidet sich leicht von dem der Keimwurzeln, da in diesen das Signal insgesamt stärker ausgefallen ist und  $\alpha$ -TIP in der Epidermis, der gesamten Rinde und in den äußeren Zellen der Kalyptra nachgewiesen werden konnte (Abbildung 8 A, B, C, E, F, und G).

Die  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung der Wurzeln der zehn Tage alten Gerstenpflanzen zeigt, dass in allen Kalyptrazellen  $\gamma$ -TIP enthalten ist. Das Signal ist jedoch am Stärksten in dem an das Meristem angrenzenden Bereich. In der Epidermis und im Zentralzylinder ist kein  $\gamma$ -TIP nachweisbar, während in der Rinde die

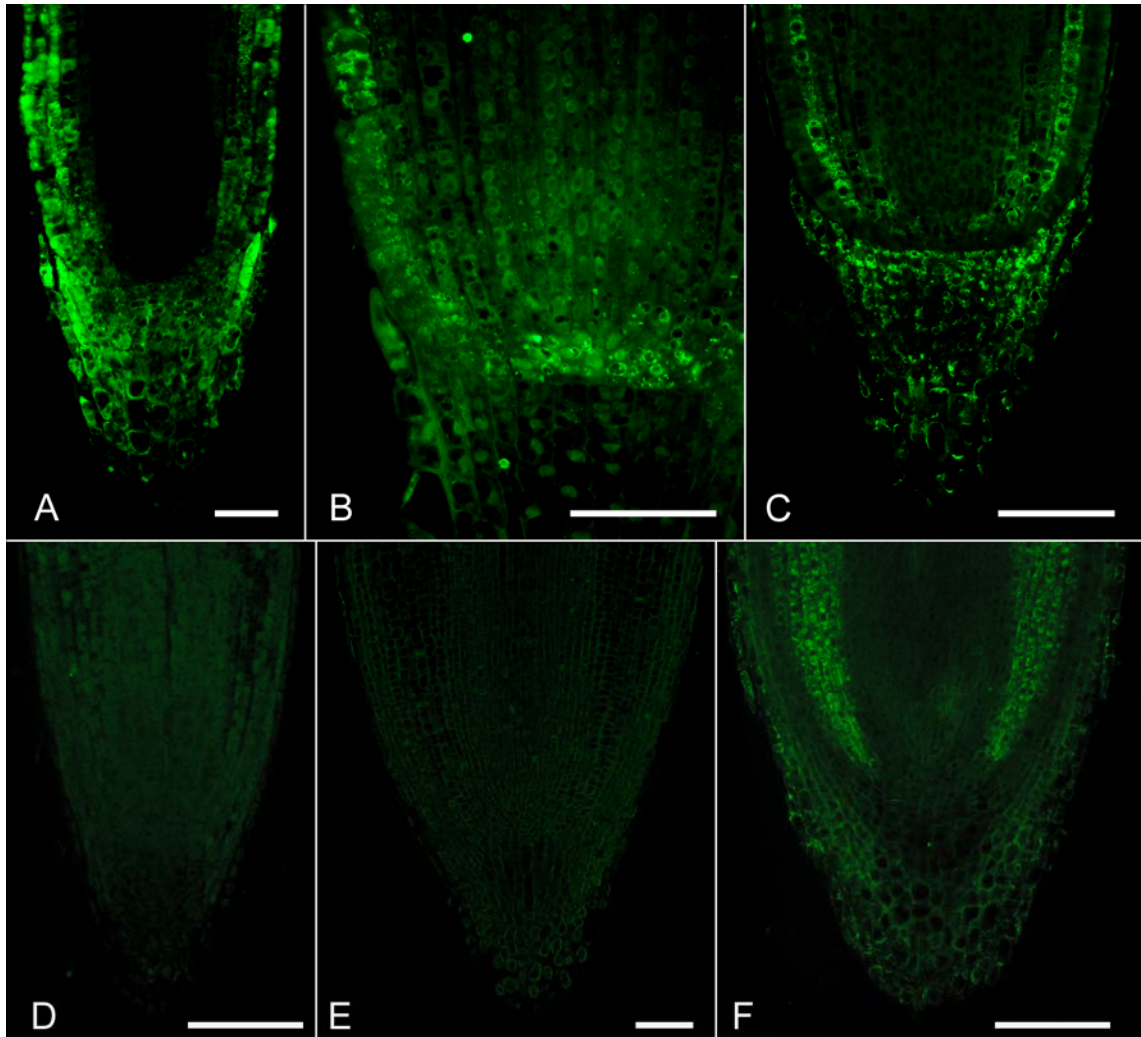
Tonoplasten der äußersten, an die Epidermis angrenzenden Zellreihe am intensivsten fluoresziert (Abbildung 16 C).

Der Vergleich zwischen den  $\gamma$ -TIP-Markierungen der beiden unterschiedlich alten Wurzeln zeigt, dass auch hier, wie bei der  $\alpha$ -TIP-Markierung, ein ähnliches Verteilungsmuster zu beobachten ist. Auch in der Keimwurzel war das  $\gamma$ -TIP-Signal in der subepidermalen Zellreihe und in der Kalyptra am stärksten.  $\gamma$ -TIP war jedoch auch in der Epidermis nachweisbar (Abbildung 10 A, B, C, E und G).

### **Erbsenwurzeln**

Im Gegensatz zu den Keimwurzeln konnten in den Wurzeln der zehn Tage alten Erbsenpflanzen weder das Speicherprotein Vicilin, noch das als Markerprotein für Proteinspeichervakuolen angesehene Aquaporin  $\alpha$ -TIP nachgewiesen werden (Abbildung 16 D und E).

$\gamma$ -TIP konnte in diesen Wurzeln jedoch, genau wie bei den Keimlingswurzeln, in den äußeren Kalyptrazellen und in den Zellen der Wurzelrinde nachgewiesen werden (Abbildung 16 F und Abbildung 11 A bis C).



**Abbildung 16: Immunofluoreszenz-Markierung der Wurzelspitzen von zehn Tage alten Gersten und Erbsen**

A - C: Immunofluoreszenz-Markierung der Wurzelspitzen von zehn Tage alten Gersten (Längsschnitte).

A: Gerstenlektin-Immunofluoreszenz-Markierung

B:  $\alpha$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum

C:  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima

D - F: Immunofluoreszenz-Markierung der Wurzelspitzen von zehn Tage alten Erbsen (Längsschnitte).

D: Vicilin-Immunofluoreszenz-Markierung

E:  $\alpha$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum

F:  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung mit dem  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiserum von Maeshima

Die Längenstandards entsprechen 100  $\mu$ m.

## 5 Diskussion

In den letzten Jahren wurden in mehreren pflanzlichen Zellen gleichzeitig zwei funktionell verschiedene Vakuolen nachgewiesen: die lytische Vakuole und die Proteinspeichervakuole (Holwerda et al., 1990; Holwerda und Rogers, 1992; Wilkins und Tiwara, 1995; Hoh et al., 1995; Paris et al., 1996; Fleurat-Lessard et al., 1997; Swanson et al., 1998). Eine solche Differenzierung innerhalb einer Zelle ist nur möglich, wenn zwei alternative sekretorische Wege zu den jeweiligen Vakuolen existieren. Diese Erweiterung des komplexen eukaryotischen Endomembransystems wurde bisher weder für die Vakuole der Hefe noch für das häufig als Äquivalent zur pflanzlichen Vakuole bezeichnete Lysosom tierischer Zellen beschrieben.

Bei der Untersuchung dieser Besonderheit der Pflanzenzellen ist es wichtig, die Vakuolentypen nicht nur aufgrund ihres Inhalts und dessen pH-Wert zu unterscheiden, sondern auch Membranproteine zu verwenden, die ein spezifisches Merkmal des jeweiligen Vakuolentyps darstellen. Die hierfür verwendeten TIP-Isoformen wurden in dieser Arbeit in Wurzelspitzengewebe auf ihre Spezifität getestet und die Hypothese der zwei unterschiedlichen Vakuolen in diesen Zellen hinterfragt.

### 5.1 Vakuolenbiogenese in der Erbsenkeimwurzelkalyptra

Hoh und Mitarbeiter untersuchten 1995 die Vakuolenbiogenese in Erbsenkotyledonen von sich entwickelnden Erbsensamen. Dabei stellte sich heraus, dass sich um die in den jungen Kotyledonenzellen vorhandenen vegetativen Vakuolen ein komplexes tubuläres und cisternales Membransystem neu ausbildet. Durch Einlagerung der Speicherproteine und durch Autophagie der umschlossenen vegetativen Vakuolen entstehen dann aus diesen Membransystemen die Proteinspeichervakuolen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die strukturelle Untersuchung der Wurzelspitzen der Erbsenkeimlinge im Elektronenmikroskop auch in Zellen der Kalyptra auffällige Membranstrukturen. In diesen Zellen waren noch keine Vakuolen zu erkennen, stattdessen aber große cytoplasmatische Regionen, die keine Organellen enthalten und von Membranstrukturen umgeben sind. Radial- und Tangentialschnitte dieser Membranstrukturen zeigen, dass es sich hierbei um glattes ER handeln könnte, das mit rauhem ER in Verbindung steht (Abbildung 5 A - D). Dies entspricht genau den Beschreibungen der Vakuolenbiogenese in Testa-Zellen von Leinsamen und Tanninproduzierenden Zellen von *Oenothera odorata* L. (Amelunxen und Heinze, 1984;

Hilling und Amelunxen, 1985). Auch hier umschließen Schläuche von glattem ER, das teilweise in Verbindung steht mit rauhem ER, eine organellenfreie Cytoplasmazone. Die Vakuolen entstehen durch Verschmelzen dieser Schläuche und Abbau des eingeschlossenen Cytoplasmas.

Interessant ist bei den Erbsenkeimwurzelspitzen, dass in den Membranstrukturen, die die organellenfreien Zonen umschließen, ebenso wie bei den in Erbsenkotyledonen beschriebenen Membranstrukturen (Hoh et al., 1995),  $\alpha$ -TIP nachgewiesen werden konnte (Abbildung 9 D, Abbildung 13 A und B). Die Markierungsdichte dieser Membranen war dabei außerordentlich hoch, während an den Membranen des ER niemals eine Ansammlung von Goldpartikeln beobachtet werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei entweder nicht um ER-Membranen handelt oder um hoch spezialisierte Regionen des ER. Es ist deshalb die Frage, ob die beobachteten Membranstrukturen als prävakuoläres Kompartiment bezeichnet werden können.

Zu dem gleichen Ergebnis führten die Untersuchungen in Gerstenkeimwurzeln. Auch hier entstehen die Vakuolen in der Nähe des Ruhezentrums scheinbar durch Einschluss einer organellenfreien, cytoplasmatischen Region (Olbrich, 2000). Die Membranstrukturen, die diese Bereiche umschließen, unterscheiden sich ebenfalls vom ER, da in ihnen die ER-residenten Chaperone Calreticulin und Calnexin nicht nachgewiesen werden konnten. Hinzu kam, dass in diesem Gewebe keine Verbindungen zwischen den umschließenden Membranen und dem rauhen ER beobachtet wurden.

Die Beobachtung dieser Arbeit, dass in den Erbsenkalyptrazellen sehr viele Dictyosomen in direkter Nähe zu den Membranstrukturen liegen, die die organellenfreie Region umschließen, und dass Vesikel des TGN mit diesen Membranen verschmelzen (Abbildung 5 E), kann auch als Indiz für die von Marty und Mitarbeitern aufgestellte Theorie zur Vakuolenbiogenese gedeutet werden (Marty, 1997 und 1999). Danach entsteht im meristematischen Wurzelgewebe von *Euphorbia characias* L. aus vom TGN gebildeten Vesikeln ein tubuläres provakuoläres Netzwerk, das eine cytoplasmatische Region wie ein Käfig umschließt. Durch Verschmelzen des Netzwerkes wird das innen liegende Cytoplasma komplett eingeschlossen und zusammen mit der inneren Membran verdaut. Die äußere Membran wird zum Tonoplast der neu entstandenen Vakuole (Marty, 1978).

Fasst man die Ergebnisse der vorliegenden Daten zusammen, deutet alles darauf hin, dass die Vakuolen der Kalyptrazellen in Erbsenkeimwurzeln durch Autophagie entstehen. Die Untersuchungen wurden jedoch an chemisch fixierten Wurzelspitzen

durchgeführt. Da das relativ langsame Eindringen der Aldehyde in die Probe eine artifizielle Veränderung der Membranen nicht ausschließt, wäre es sinnvoll, vergleichend Wurzelspitzen zu untersuchen, die mit Hilfe der wesentlich schnelleren physikalischen Immobilisierung durch Hochdruckgefrieren fixiert worden sind (siehe Kap. 5.7; Gilkey und Staehelin, 1986).

## **5.2 Ist $\alpha$ -TIP ein Markerprotein für Proteinspeichervakuolen?**

Durch die Immunofluoreszenz-Markierung der Speicherproteine in den Keimwurzeln wurde zunächst festgestellt, in welchen Zelltypen Speicherproteine in den Vakuolen eingelagert werden. Vergleicht man dieses Verteilungsmuster mit dem des als Markerprotein für Proteinspeichervakuolen angesehenen  $\alpha$ -TIP (siehe Kap. 2.1), stellt man fest, dass diese nicht vollständig übereinstimmen.

Das Gerstenlektin wurde in der gesamten Gerstenkeimwurzel-Kalyptra nachgewiesen, während  $\alpha$ -TIP nur in den äußeren Zellen, aber nicht in der Columella identifiziert werden konnte (Abbildung 6 A - C, Abbildung 8 A, B, C, E, F und G). Auch im Elektronenmikroskop waren im Innern der Kalyptra Vakuolen mit Proteinaggregaten im Lumen zu erkennen, die keine  $\alpha$ -TIP-Immunogold-Markierung am Tonoplast aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

In der meristematischen Region hingegen ist  $\alpha$ -TIP in einem größeren Bereich der Rinde und in einzelnen Zellen des Zentralzylinders nachweisbar, während das Gerstenlektin nur in der Epidermis und in den zwei bis drei angrenzenden Zellreihen der Rinde identifiziert werden konnte (Abbildung 6 A - C, Abbildung 8 A, B, C, E, F und G).

Zieht man nun die Ergebnisse der Erbsenkeimwurzel hinzu, fällt auf, dass in beiden Wurzeln  $\alpha$ -TIP in denselben Regionen vorkommt: In den äußeren Kalyptrazellen, aber nicht in der Columella, in den Rindenzellen und im Parenchym des Zentralbereichs (Abbildung 9 A, B, C, E, F und G, Abbildung 8 A, B, C, E, F und G). Die Vicilin-Verteilung in der Erbsenkeimwurzel unterscheidet sich jedoch deutlich von der des Lektins in der Gerstenkeimwurzel (Abbildung 7 A - C, Abbildung 6 A - C) und weist mehr Parallelen zu der  $\alpha$ -TIP-Markierung auf (Abbildung 9 A, B, C, E, F und G). Dies ist besonders deutlich in der meristematischen Region, wo die Rindenzellen und die Parenchymzellen des Zentralbereichs bei beiden Markierungen das Signal tragen. In der Kalyptra fluoreszieren jedoch bei der Vicilin-Markierung die Zellen, die an das

Meristem angrenzen und nicht, wie bei der  $\alpha$ -TIP-Markierung die äußeren Zellen (Abbildung 7 A - C, Abbildung 9 A, B, C, E, F und G).

Zusammenfassend kann man deshalb feststellen, dass die  $\alpha$ -TIP- und die Speicherprotein-Markierung in den Gersten- und Erbsenkeimwurzeln größtenteils überlappen. Es gibt jedoch in beiden Wurzeln sowohl Bereiche, in denen die Vakuolen Proteine eingelagert haben und trotzdem in dieser Region kein  $\alpha$ -TIP in den Tonoplasten nachgewiesen werden konnte, als auch Bereiche, in denen die Vakuolen die  $\alpha$ -TIP-Markierung tragen und dennoch keine Speicherproteine detektiert werden konnten. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von  $\alpha$ -TIP im Tonoplast kann deshalb in Keimwurzeln nicht als klares Indiz für die Funktion der Vakuole dienen. Auch in den protoplastierten Aleuronzellen der Gerste enthielten sowohl die Proteinspeichervakuolen als auch die von diesen morphologisch differierenden lytischen Vakuolen (die von den Autoren als Sekundär-Vakuolen bezeichnet wurden)  $\alpha$ -TIP (Swanson et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Proteineinlagerungen ist das Verteilungsmuster von  $\alpha$ -TIP innerhalb der Keimlingswurzeln der untersuchten Mono- und Dikotyledonen sehr ähnlich. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich hierbei um ein generelles Muster der Zelltyp-spezifischen Expression von  $\alpha$ -TIP in Keimlingswurzeln handeln könnte.

### **5.3 Ist $\gamma$ -TIP ein Markerprotein für lytische Vakuolen?**

Das Aquaporin  $\gamma$ -TIP wird als Markerprotein für lytische Vakuolen angesehen (siehe Kap. 2.1). Die Signalverteilung der  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung in der Gerstenkeimwurzel weist jedoch eine erstaunliche Ähnlichkeit zur Lektin-Markierung auf (Abbildung 10 A, B, C, E, und G, Abbildung 6 A - C). Im Elektronenmikroskop wird deutlich, dass auch der Tonoplast der Vakuolen der äußeren Kalyptrazellen und der Rindenzellen der meristematischen Region, in denen die Speicherproteinaggregate sichtbar sind, die  $\gamma$ -TIP-Immunogoldmarkierung tragen (Abbildung 10 F). Die Markierungsdichte ist jedoch in den Rindenzellen im Bereich der Streckungszone, in denen die Vakuolen keine sichtbaren Proteinaggregate beinhalten, wesentlich höher als in den äußeren Kalyptrazellen (Abbildung 10 D). Im Innern der Kalyptra war im



Elektronenmikroskop im Gegensatz zu der Immunofluoreszenz-Markierung keine  $\gamma$ -TIP-Markierung sichtbar.

$\gamma$ -TIP ist also nicht nur in den gleichen Regionen der Wurzel wie das Gerstenlektin lokalisiert, sondern konnte auch eindeutig in den Tonoplasten der Proteinspeichervakuolen nachgewiesen werden.

Die Kolokalisierung von Gerstenlektin und  $\gamma$ -TIP wurde auch schon in vereinzelten Zellen von Gerstenkeimwurzel-Quetschpräparaten nachgewiesen (Jauh et al., 1999). Sie wurde als weiterer Hinweis auf die schon 1996 von Paris und Mitarbeitern aufgestellte Theorie gesehen, dass die zunächst gleichzeitig in einer Zelle existierenden Proteinspeichervakuolen und lytischen Vakuolen fusionieren. Die so entstandenen Vakuolen weisen, bis sie vollständig ausdifferenziert sind, die Markerproteine beider Vakuolentypen auf.

In den Erbsenkeimwurzeln kann im Gegensatz zu den Gerstenkeimwurzeln keine Ähnlichkeit zwischen der Speicherprotein- und der  $\gamma$ -TIP-Verteilung festgestellt werden. Zwar sind beide Proteine in der Rinde nachweisbar, aber das Signal ist innerhalb der Rinde unterschiedlich verteilt. Vicilin ist vom Ruhezentrum ausgehend in der gesamten Rinde präsent, während  $\gamma$ -TIP zunächst nur in den innen liegenden Zellreihen der Rinde und erst in der Streckungszone in der gesamten Rinde nachweisbar ist. Ein weiterer Unterschied ist, dass das  $\gamma$ -TIP weder in der Epidermis noch im Zentralzylinder oder in den an das Meristem angrenzenden Zellen der Kalyptra nachgewiesen werden kann.

Vergleicht man die  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierungsmuster von den Gersten- mit den Erbsenkeimwurzeln, ist die auffälligste Gemeinsamkeit zugleich das überraschenste Ergebnis dieser Markierung: In beiden Wurzeln konnte kein  $\gamma$ -TIP im Bereich des sich ausbildenden Zentralzylinders nachgewiesen werden. Gerade in diesem Bereich der Wurzel, in dem in der Gerstenkeimwurzel kein und in der Erbsenkeimwurzel nur in den Parenchymzellen Speicherproteine eingelagert werden, erwartet man jedoch lytische Vakuolen. Im Elektronenmikroskop sind hier eindeutig Vakuolen zu erkennen, die im Fall der Gerstenkeimwurzeln alle keine Proteinaggregate beinhalten (Daten nicht gezeigt).

Die Möglichkeit, dass die für die Immunofluoreszenz-Markierung verwendete Fixierung eventuell gerade den zentralen Teil der Wurzel nicht ausreichend erhalten und damit den Immunnachweis speziell in dieser Region erschwert oder verhindert hat, musste in Betracht gezogen werden. Als Kontrolle wurde deshalb eine

Immunofluoreszenz-Markierung der V-ATPase durchgeführt, da von diesem vakuolären Membranprotein bekannt ist, dass es allgemein in relativ hohen Konzentrationen im Tonoplast vorkommt (15 % des Tonoplastenproteins in Mungbohnen-Hypokotyl; Maeshima, 2001 und Matsuura-Endo et al., 1990) und schon in Wurzelspitzen von verschiedenen Pflanzen nachgewiesen wurde (Golldack und Dietz, 2001; Oberbeck et al., 1994; Hermann et al., 1994).

Die V-ATPase-Immunofluoreszenz-Markierungen der Gersten- und Erbsenkeimwurzeln zeigt, dass in allen Regionen der Keimwurzelspitzen die V-ATPase nachgewiesen werden kann. Das Fluoreszenzsignal war jedoch innerhalb der Zellen nicht ausschließlich auf die Tonoplasten beschränkt, sondern auch diffus im Cytoplasma verteilt. Dies war zu erwarten, da ein Antiserum gegen die A-Untereinheit der V-ATPase verwendet wurde. Diese Untereinheit wird im Cytosol synthetisiert und wird dann am ER Teil der ins Cytosol ragenden  $V_1$ -Einheit, die an die in die Membran integrierte  $V_0$ -Einheit assoziiert ist (Sze et al., 1999). Über die Dissoziation und Assoziation der  $V_1$ -Einheit an die  $V_0$ -Einheit wird die Aktivität der V-ATPase reguliert (Iwata et al., 2004; Sze et al., 1999). Deshalb liegen *in vivo* sowohl die neu synthetisierten A-Untereinheiten als auch die dissoziierten  $V_1$ -Einheit, die die A-Untereinheiten beinhalten, im Cytosol vor.

Betrachtet man nun bei der V-ATPase-Immunofluoreszenz-Markierung speziell den Bereich des sich ausbildenden Zentralzylinders, so wird deutlich, dass auch diese Zellen Vakuolen enthalten und dass deren Tonoplasten mit dem V-ATPase-Antiserum markiert werden konnten. Die Kontrolle bestätigt also, dass die verwendete Fixierung auch einen Immunnachweis der Membranproteine im Zentralbereich der Wurzelspitzen gewährleistet.

Daraus folgt, dass bei den Gerstenkeimwurzeln alle Zellen des sich ausbildenden Zentralzylinders und bei den Erbsenkeimwurzeln alle Zellen mit Ausnahme weniger Parenchymzellen eindeutig Vakuolen beinhalten, in denen keine Speicherproteine nachweisbar sind und die somit lytische Vakuolen darstellen sollten. Die Tonoplasten dieser Vakuolen konnten jedoch nicht mit dem  $\gamma$ -TIP-Antiserum markiert werden.

Da  $\gamma$ -TIP zusätzlich, wie oben beschrieben, in Proteinspeichervakuolen nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob  $\gamma$ -TIP in den Keimwurzeln als Markerprotein für lytische Vakuolen angesehen werden kann.

## **5.4 $\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Lokalisierung im Vergleich**

Sowohl die Western-Blot-Analysen als auch die wesentlich genauere Bestimmung durch die Immunofluoreszenz- und die Immunogold-Markierung der Keimwurzeln haben gezeigt, dass  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP zu einem großen Teil in den gleichen Bereichen der Keimwurzeln nachgewiesen werden können. Es war nun von Interesse, ob  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP in einer Zelle in unterschiedlichen Vakuolen vorkommen.

### **Die Doppel-Markierungs-Methode**

Da alle zur Verfügung stehenden TIP-Antiseren aus Kaninchen stammen, musste eine Doppelmarkierungs-Methode gefunden werden, die eine Kreuzreaktion zwischen den nacheinander durchgeführten Markierungen ausschließt.

Hierfür werden unterschiedliche Methoden angewendet. Es ist möglich, die Antikörper der ersten Markierung durch eine Behandlung mit Paraformaldehyd-Dampf zu fixieren und so stark zu denaturieren bis in einer Kontrolle das Sekundär-Antiserum der zweiten Markierung keine Kreuzreaktion mehr mit dem Primär-Antikörpern der ersten Markierung zeigt (Mahendrasingam et al., 2004). Dies setzt jedoch auch die Antigenizität der Proteine herab, die in der zweiten Markierung nachgewiesen werden sollen. Diese Methode eignet sich deshalb nicht für die gegen Fixative sehr sensitive Immunogold-Markierung der Aquaporine.

Eine weitere Methode, die Antikörper der ersten Markierung für die Antiseren der zweiten Markierung unzugänglich zu machen, ist das Absättigen der potentiellen Primär-Antikörper-Antigene durch Inkubation mit einem Überschuss an Anti-Kaninchen F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten (Paris et al., 1996). Diese Methode kann jedoch, ebenso wie die Aldehyd-Methode, eine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern der ersten und zweiten Markierung nicht vollkommen ausschließen.

Deshalb wurde für die Doppelmarkierung eine andere Methode angewandt, bei der die beiden Markierungen physikalisch getrennt voneinander durchgeführt werden. Dafür werden Keimwurzeln verwendet, die in ein Harz eingebettet wurden. Schneidet man diese, liegt das Gewebe in einem durchgängigen Schnitt, der wie eine Plastikfolie von der Unter- und Oberseite behandelt werden kann, ohne dass die verwendeten Lösungen Kontakt zur jeweils anderen Seite des Schnittes bekommen (siehe 3.4.6).

Für die Immunogold-Markierung erwies sich jedoch die zunächst verwendete Aldehyd/Osmium-Fixierung mit anschließender Einbettung in LR-White als unbrauchbar, da diese die Antigenizität der Aquaporine stark herabsetzt oder zerstört

(Olbrich, 2000). Stattdessen wurden die Keimwurzeln ausschließlich mit Aldehyden fixiert und unter progressiver Verringerung der Temperatur entwässert und in HM20 eingebettet. Die Polymerisierung des Harzes bei  $-35^{\circ}\text{C}$  und der Verzicht auf das Lipid-vernetzende und damit in die Membranen einlagernde Osmiumtetroxid wirkten sich positiv auf den Erhalt der Membranprotein-Antigene aus und ermöglichte die Immunogold-Markierung der Aquaporine.

Zur Kontrolle der in Kapitel 3.4.6 ausführlich beschriebenen Doppelmarkierungsmethode wurde für die zweite Markierung zunächst kein Primär-Antikörper verwendet. Damit konnte nachgewiesen werden, dass der Sekundär-Antikörper der zweiten Markierung nicht mit den Primär-Antikörpern der ersten Markierung kreuzreagiert (Daten nicht gezeigt).

### **Das Ergebnis der $\alpha$ - und $\gamma$ -TIP-Doppel-Markierung**

In den Gerstenkeimwurzeln wiesen fast alle Vakuolen in der Kalyptra an den Tonoplasten sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\gamma$ -TIP-Markierung auf (Abbildung 12 B und E). Dabei waren in allen Vakuolen Proteinaggregate zu erkennen, in denen in vorhergehenden Markierungen das Gerstenlektin nachgewiesen werden konnte. Diese Vakuolen wurden deshalb als Proteinspeichervakuolen definiert. Nur äußerst selten konnten sehr kleine Vakuolen beobachtet werden, die nur die  $\alpha$ -TIP-Markierung trugen (Abbildung 12 E). Dies können Prävakuolen oder kleine neu entstandene Vakuolen gewesen sein. Es ist jedoch auch möglich, dass es sich hierbei um seitlich angeschnittene größere Vakuolen handelte, die in diesem Bereich des Tonoplasten entweder zufällig oder gezielt gehäuft  $\alpha$ -TIP enthielten. Eine solche Spezialisierung einzelner Tonoplastenbereiche wurde in transgenen *Arabidopsis* Kotyledonenzellen beobachtet (Saito et al., 2002). Hier führte die Überexpression von  $\gamma$ -TIP, das mit GFP („green fluorescent protein“) fusioniert worden war, zusätzlich zum Fluoreszieren der gesamten Tonoplasten zu einer Konzentration des Signals in runden Strukturen von 1 - 3  $\mu\text{m}$  Durchmesser innerhalb der Vakuolen. Nach der Interpretation der Autoren handelt es sich bei diesen Strukturen um Einstülpungen einer Tonoplastenregion, in der sich das Aquaporinkonstrukt angesammelt hat. Die in der Gerstenkalyptra beobachteten kleinen  $\alpha$ -TIP-Vakuolen lagen jedoch immer neben größeren Vakuolen und nicht innerhalb. Reine  $\gamma$ -TIP-Vakuolen wurden nicht beobachtet.

Im meristematischen Bereich der Gerstenkeimwurzeln konnte in den Zellen in der Nähe des Ruhezentrums in den Tonoplasten der Proteinspeichervakuolen ausschließlich

$\alpha$ -TIP nachgewiesen werden (Abbildung 12 A). Je weiter die Zellen in der Wurzelrinde vom Ruhezentrum entfernt lagen, desto eindeutiger konnte zusätzlich zum  $\alpha$ -TIP auch  $\gamma$ -TIP in den Tonoplasten dieser Vakuolen detektiert werden (Abbildung 12 D). Die in den Zellen des sich ausbildenden Zentralzylinders liegenden Vakuolen zeigten weder ein Signal der  $\alpha$ - noch der  $\gamma$ -TIP-Markierung (Daten nicht gezeigt). Reine  $\gamma$ -TIP-Vakuolen konnten ebenfalls in der meristematischen Region der Wurzel nicht identifiziert werden.

Auch die Ergebnisse der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP-Doppel-Markierung der Erbsenkeimwurzel bestätigen, dass keine reinen  $\gamma$ -TIP-Vakuolen in den Keimwurzeln existieren. Gerade die in der Kalyptra beobachtete Region der Vakuolenbiogenese durch Autophagie bietet sich für ein Studium der Aquaporin-Verteilung in verschiedenen Entwicklungsstadien der Vakuolen an (siehe 5.1). Die Membranstrukturen, die eine organellenfreie Zone des Cytoplasmas umschließen, enthalten zunächst ausschließlich  $\alpha$ -TIP (Abbildung 13 A und B). Im Zuge der Entwicklung verschmelzen die Membranen und das Lumen der Membranstrukturen wird größer. In diesem Stadium ist auch  $\gamma$ -TIP in den Membranen nachweisbar (Abbildung 13 C). In der äußeren Membran, die zum Tonoplast wird, sind  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP enthalten, während die innere Membran und das eingeschlossene Cytoplasma abgebaut werden.

Auch in den Rindenzellen der meristematischen Region ist in den Tonoplasten  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP enthalten (Abbildung 13 D). Diese Vakuolen können aufgrund der im Elektronenmikroskop in ihrem Lumen gut sichtbaren Proteinaggregate als Proteinspeichervakuolen identifiziert werden.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass in der Keimwurzel zunächst in den neu gebildeten Vakuolen ausschließlich  $\alpha$ -TIP in den Tonoplasten enthalten ist. Im Zuge der Reifung dieser Vakuolen gelangt ebenfalls  $\gamma$ -TIP in die Tonoplasten. Die Koexistenz von zwei verschiedenen Vakuolen innerhalb der Keimwurzelzellen, die unterschiedliche TIP-Isoformen enthalten, wie zuvor beschrieben (Paris et al., 1996; Jauh et al., 1999), konnte nicht bestätigt werden.

Um die Diskrepanz der Ergebnisse zu diskutieren, ist es wichtig, die verwendeten Methoden genau zu vergleichen:

Die Ergebnisse der Doppel- und Dreifach-Markierungen der zitierten Arbeiten beruhen ausschließlich auf Immunofluoreszenz-Markierungen. Die für die Doppel-

Markierungen dieser Arbeit verwendete Immunogold-Markierung konnte hingegen bei wesentlich höherer Auflösung im Elektronenmikroskop ausgewertet werden. Nur dies ermöglicht die genaue morphologische Bestimmung der markierten Kompartimente. So können Ansammlungen der einzelnen Aquaporine im ER, Golgi-Apparat oder in den verschiedenen sekretorischen Vesikeln, ebenso wie Tonoplasten, die in einzelnen Bereichen eine Konzentration eines Aquaporins zeigen, im Fluoreszenzmikroskop eventuell als einzelne kleine Vakuolen erscheinen. Im Elektronenmikroskop hingegen können diese Strukturen identifiziert werden.

Zudem wurden die Doppel- und Dreifach-Immunofluoreszenz-Markierungen der zitierten Arbeiten an Quetschpräparaten der Keimwurzeln durchgeführt. Hier konnten die Zellen der unterschiedlichen Wurzelregionen nicht unterschieden werden und der Entwicklungsstand der Zellen nur aufgrund ihrer Größe abgeschätzt werden. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit sowohl für die Immunogold- als auch für die Immunofluoreszenz-Markierungen intakte Keimwurzeln fixiert. Dies ermöglichte, dass die Zellen aufgrund ihrer Lage innerhalb der Wurzeln den unterschiedlichen Zelltypen zugeordnet werden konnten und deren relativer Entwicklungsstand an ihrem Abstand zum Meristem abgelesen werden konnte. Dadurch konnten die Markierungen wesentlich differenzierter ausgewertet werden.

Hinzu kommt, dass bei der Immunofluoreszenz-Markierung von Quetschpräparaten eine gleichmäßige Durchdringung aller Zellen mit den Antiseren und deren Auswaschung nicht in dem Maße gewährleistet ist, wie bei der Verwendung von gleichmäßigen Schnitten. Dies kann besonders dann zu fehlerhaften Markierungen führen, wenn bei einer Doppelmarkierung mit zwei Antiseren aus Kaninchen der Primär-Antikörper der ersten Markierung durch Inkubation mit einem Überschuss an  $F(ab')_2$ -Fragmenten gegen eine Kreuzreaktion mit dem Sekundär-Antikörper der zweiten Markierung abgeschirmt werden muss (siehe Kap. 5.4).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den Untersuchungen ist, dass für die Lokalisierung des  $\gamma$ -TIP unterschiedliche Antiseren verwendet wurden. Die von Paris und Mitarbeitern und von Jauh und Mitarbeitern eingesetzten TIP-Antiseren sind alle gegen die gesamten TIP-Proteine gerichtet. Da die einzelnen Aquaporine hochgradig homolog zueinander sind, ist die Gefahr gegeben, dass ein gegen ein gesamtes TIP-Protein gerichtetes Antiserum ebenfalls mit anderen TIP-Isotypen reagiert (Maurel et al., 2002). Deshalb wurden in dieser Arbeit Antiseren bevorzugt, die gegen kleine Peptide gerichtet sind, die abgeleitet von den TIP-Aminosäuresequenzen spezifisch für

die einzelnen TIP-Isoformen sind. Ein Vergleich der  $\alpha$ -TIP-Markierungen vom  $\alpha$ -TIP-Protein-Antiserum und vom  $\alpha$ -TIP-Peptid-Antiserum zeigte, dass die beiden Antiseren das gleiche Markierungsmuster zeigen (siehe Kap. 4.4). Für  $\gamma$ -TIP konnte diese Kontrolle nicht durchgeführt werden, da das in den vorhergehenden Studien verwendete Antiserum gegen das gesamte  $\gamma$ -TIP-Protein (TIP-Ma27) aus Rote Beete nicht mehr zur Verfügung stand (Marty-Mazars et al., 1995). Die Ergebnisse des Western-Blots und der Immunogold-Markierungen dieser Arbeit zeigen, dass die verwendeten  $\gamma$ -TIP-Peptid-Antiseren spezifisch mit einem  $\gamma$ -TIP-Protein reagieren. Da die Genome der Gersten- und Erbsenpflanzen jedoch noch nicht vollständig sequenziert worden sind, kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie viele  $\gamma$ -TIP-Gene in den jeweiligen Pflanzen vorliegen. Da in *Arabidopsis* drei und in Mais zwei  $\gamma$ -TIP-Gene vorliegen (Johanson et al., 2001; Chaumont et al., 2001), ist es jedoch nicht unwahrscheinlich, dass auch die in dieser Studie untersuchten Pflanzen mehrere  $\gamma$ -TIP-Gene aufweisen. Es ist deshalb möglich, dass das  $\gamma$ -TIP-Protein-Antiserum, das in den zitierten Arbeiten verwendet wurde, mit einem anderen oder einem weiteren  $\gamma$ -TIP- oder TIP-Protein kreuzreagiert hat.

Die differierenden Ergebnisse können jedoch auch Folge von unterschiedlichen Anzuchtbedingungen der Keimwurzeln sein. Beobachtungen an transgenen *Arabidopsis*-Wurzeln, in denen durch die Expression eines an GFP fusionierten vakuolären Membranproteins die Vakuolen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind, haben gezeigt, dass je nach Osmolarität des die Wurzel umgebenden Mediums die Morphologie der Vakuolen verändert ist (Uemura et al., 2002). In destilliertem Wasser war in den Rindenzellen jeweils eine große Zentralvakuole sichtbar, während in einer isotonischen und in einer hypertonischen Lösung viele komplexe, intravakuoläre Strukturen zu beobachten waren.

Die für diese Arbeit verwendeten Keimlinge wurde auf mit destilliertem Wasser angefeuchtetem Filterpapier angezogen. In den Veröffentlichungen von Paris und Mitarbeitern und Jauh und Mitarbeitern wurden die genauen Anzuchtbedingungen nicht angegeben. Es ist also möglich, dass die von ihnen verwendeten Keimwurzelspitzen anderen osmotischen Bedingungen ausgesetzt waren und sich dadurch bedingt die Morphologie der Vakuolen unterscheidet.

## **5.5 Gibt es auch in Wurzeln von älteren Pflanzen**

### ***Proteinspeichervakuolen?***

Eines der interessantesten Ergebnisse der Untersuchungen der Vakuolen von Keimwurzeln war, dass in den meisten Regionen der Keimwurzeln die Zellen ausschließlich Proteinspeichervakuolen aufweisen. Es stellte sich nun die Frage, ob auch in Wurzeln von älteren Pflanzen Speicherproteine in den Vakuolen angesammelt werden. Dabei zeigte die Immunofluoreszenz-Markierung von Wurzelspitzen von zehn Tage alten Gersten und Erbsen einen interessanten Unterschied zwischen den beiden Pflanzenarten.

In den Gerstenwurzeln ist das Gerstenlektin, ebenso wie in den Keimwurzeln, in der Epidermis, den äußeren Zellreihen der Rinde und der Kalyptra lokalisiert. Auch die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -TIP-Immunofluoreszenz-Markierung zeigt eine im Vergleich zur Keimwurzel im Wesentlichen unveränderte Signalverteilung. Im Gegensatz dazu konnte weder Vicilin noch  $\alpha$ -TIP in den Wurzeln der zehn Tage alten Erbsen nachgewiesen werden, während das Signal der  $\gamma$ -TIP-Markierung in den gleichen Regionen der Wurzel zu finden war wie bei der Keimwurzel.

Da die Fluoreszenzsignale bei den Immuno-Markierungen der Erbsenkeimwurzeln immer schwächer waren als bei den Gerstenkeimwurzeln, konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die Vicilin- und  $\alpha$ -TIP-Konzentrationen in den Wurzeln der zehn Tage alten Erbsen unter der Nachweisgrenze liegen. Die Immunofluoreszenz-Markierungen wurden jedoch mehrmals wiederholt und dabei Primär-Antikörperlösungen verwendet, die höher konzentriert waren als die bei der Markierung der Erbsenkeimwurzeln eingesetzten Lösungen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Vicilin und  $\alpha$ -TIP nicht oder nur in extrem schwacher Konzentration in den Wurzeln der zehn Tage alten Erbsen vorkommt. Dieses Ergebnis konnte leider nicht mittels eines Western-Blots nachgeprüft werden, da es äußerst schwer möglich ist, für die Proteinaufreinigung eine entsprechend große Anzahl an unverletzten Wurzelspitzen von in Erde wachsenden Erbsen zu gewinnen.

Dass in der Wurzel der zehn Tage alten Erbsen weder das Speicherprotein noch  $\alpha$ -TIP nachweisbar war, während in den Gerstenwurzeln beides vorkommt, liefert wieder einen Hinweis darauf, dass das Vorkommen von  $\alpha$ -TIP und Speicherproteinen gekoppelt ist. So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass  $\alpha$ -TIP nur in den



Wurzeln nachweisbar ist, in denen auch Speicherproteine eingelagert werden, während  $\gamma$ -TIP in allen untersuchten Wurzeln detektiert werden konnte.

### **5.6 Welche Funktion haben Speicherproteine in Wurzelspitzen?**

Die Frage, warum das Gerstenlektin auch in älteren Gerstenwurzeln in großen Mengen eingelagert wird, während Vicilin in den älteren Erbsenwurzeln nicht mehr nachweisbar ist, führt zu der Vermutung, dass die Einlagerung dieser beiden Proteine in den jeweiligen Wurzeln eine unterschiedliche Funktion erfüllt.

Da das Vicilin nur in den Keimlingswurzeln nachgewiesen werden konnte, scheint es sich um einen kurzzeitigen Stickstoff- und Energie-Zwischenspeicher zu handeln. Dabei ist interessant, dass die Western-Blot-Analysen gezeigt haben, dass die ebenfalls in den Keimwurzeln eingelagerten Legumine ausschließlich als unprozessierte Prolegumine vorliegen. Die Keimwurzel-Viciline hingegen liegen prozessiert und unprozessiert vor. Das mit den Vicilin-Antikörpern nachgewiesene ca. 60 kDa große Protein wurde jedoch in den Erbsenkotyledonen nicht beschrieben (Chrispeels et al., 1982 a und b). Es ist möglich, dass es sich hierbei um ein Vicilin der Proteinfamilie handelt, das nur in den Wurzeln synthetisiert wird. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass es sich hierbei um ein anders als in den Kotyledonen prozessiertes Vicilin handelt. Daraus folgt, dass in den Keimwurzeln scheinbar weniger oder andere Prozessierungsenzyme vorliegen oder dass der pH-Wert in der Vakuole oder anderen sekretorischen Kompartimenten im Vergleich zu denen der Kotyledonen verändert ist, was die Aktivität der Enzyme beeinflusst.

Die generelle Speicherung von Proteinen wurde auch schon in Wurzeln von ausgewachsenen Pflanzen beobachtet. Dabei wurde das vegetative Speicher-Protein (VSP) in der Pfahlwurzel des Raps in den Vakuolen der Parenchymzellen in der Nähe des Phloems nachgewiesen (Rossato et al., 2002). Auch das Vicilin ist in den Erbsenkeimwurzeln nah am und im sich ausbildenden Zentralzylinder lokalisiert.

Das Gerstenlektin hingegen ist ausschließlich in der Peripherie der Wurzeln nachweisbar. Hinzu kommt, dass es auch in den älteren Wurzeln unverändert eingelagert wird. Die Funktion des Gerstenlektins könnte deshalb über die reine Stickstoff- und Energiespeicherung hinausgehen. Einen weiteren Hinweis hierauf liefert die Eigenschaft, nach der die Lektine, die nicht homolog zueinander sind, als solche

klassifiziert worden sind. Alle besitzen die Fähigkeit, Kohlenhydrate mehr oder weniger spezifisch zu erkennen und zu binden (Peumans und Van Damme, 1995). Obwohl nicht klar ist, ob die Lektine, die alle gänzlich unterschiedliche Strukturen und Bindeeigenschaften aufweisen, die gleiche physiologische Rolle spielen, gibt es Hinweise darauf, dass die meisten Lektine den Pflanzen zum Schutz gegen unterschiedliche Herbivore dienen (Chrispeels und Raikhel, 1991). Für das Weizenlektin, das hoch homolog zum Gerstenlektin ist, konnte gezeigt werden, dass es die Entwicklung von Insektenlarven inhibiert (Murdock et al., 1990). Die Lektine wirken jedoch bei rohem Verzehr auch auf höhere Tiere und verursachen auch beim Menschen akute Übelkeit, gefolgt von Erbrechen und Durchfall (Peumans und Van Damme, 1995).

Dass das Gerstenlektin ausschließlich in den äußeren Zellen der Gerstenwurzeln eingelagert wird, spricht für seine Funktion als Fraßschutz. Da zusätzlich davon auszugehen ist, dass das Gerstenlektin durch den permanenten Abrieb der abgestorbenen, äußeren Kalyptrazellen in der unmittelbaren Umgebung der Wurzel in die Erde gelangt, ist es interessant, dass es Lektine gibt, die spezifisch Chitin binden können (Shibuya et al., 1987; Knibbs et al., 1991). Da Chitin sowohl Bestandteil der Zellwand von Pilzen als auch des Exoskeletts von Invertebraten ist, kann auch freies Lektin in der Wurzelumgebung dem Schutz gegen Pilze und Herbivore dienen. Im Fall des Weizenlektins wurde mit *in vitro* Studien zunächst gezeigt, dass es die Keimung der Sporen und das Wachstum der Hyphen von *Trichoderma viride* verhindert. Diese Wirkung konnte jedoch später auf eine Verunreinigung des verwendeten Lektins mit Chitinasen zurückgeführt werden (Schlumbaum et al., 1986). Das Weizenlektin bindet jedoch nachweislich sehr spezifisch an die Zellwand von Pilzen und eignet sich deshalb, gekoppelt an einen Fluoreszenzfarbstoff, hervorragend zur Identifizierung von Mykorrhiza-Hyphen in Wurzelgeflechten (Meyberg, 1988).

## 5.7 Ausblicke

In dieser Untersuchung wurden in den Kalyptrazellen der Erbsenkeimwurzeln Membranstrukturen entdeckt, die ein sehr frühes Stadium der Vakuolenbiogenese darzustellen scheinen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Membranstrukturen um Fixierungs-Artefakte handelt, da die Wurzeln chemisch durch Aldehyde fixiert wurden. Da die Erbsenkeimwurzel-Kalyptrazellen für die Untersuchung der *de novo* Bildung von Vakuolen nach den vorliegenden Ergebnissen sehr geeignet erscheinen, sollten diese Zellen durch die wesentlich schnellere physikalische Immobilisierung durch Hochdruckgefrieren fixiert (Gilkey und Staehelin, 1986) und erneut ultrastrukturell untersucht werden. Aufbauend hierauf wäre es lohnenswert, durch eine erweiterte immunologische Untersuchung dieser Membranstrukturen, deren Herkunft durch den Nachweis von Markerproteinen zu klären. Hierfür würden sich Immunogold-Markierungen von ER-Proteinen, wie z. B. BiP („**b**inding protein“), Calnexin oder Calreticulin, und von Golgi-Proteinen, wie z. B. dem RGP („**r**eversibly glycosylated protein“), anbieten.

Von der Verwendung der TIP-Isoformen, als Marker für die Tonoplasten von verschiedenen Vakuolentypen, sollte in Zukunft aufgrund der vorliegenden Daten zumindest in Wurzelgeweben abgesehen werden. Generell ist die Frage, ob, neben den Inhaltsstoffen, nicht besser Proteine als Marker für verschiedene Vakuolentypen genutzt werden sollten, die auch in den Pflanzenzellen für die Sortierung zu den jeweiligen Vakuolen dienen. SNARE-Proteine haben beispielsweise bei der spezifischen Fusion von Vesikeln mit ihrem jeweiligen Zielkompartiment eine Schlüsselfunktion (Bonifacino und Glick, 2004). Die in den Zielkompartimenten enthaltenen t-SNAREs müssen, wenn zwei verschiedene Vakuolen in einer Zelle vorkommen, im Gegensatz zu den Aquaporinen, spezifisch für den jeweiligen Vakuolentyp sein. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt konzentriert sich die Erforschung der SNARE-Proteine in Pflanzen auf *Arabidopsis thaliana*. In ihrem Genom konnten allein 60 SNARE-Gene identifiziert werden (Surpin und Raikhel, 2004). Die meisten wurden bisher jedoch noch nicht lokalisiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass AtVAM3 ein potentiell t-SNARE der *Arabidopsis*-Vakuolen ist (Sato et al., 1997). In *Arabidopsis* ist jedoch bisher leider kein Gewebe bekannt, in dem in einzelnen Zellen zwei Vakuolentypen vorkommen. Sollten auch bei näherer Untersuchung der Samenanlagen keine Zellen mit lytischen Vakuolen und Proteinspeichervakuolen gefunden werden, kann in *Arabidopsis* keine

Identifizierung von SNAREs, die für die Proteinspeichervakuolen spezifisch sind, erfolgen. Da die gleichzeitige Existenz von lytischen Vakuolen und Proteinspeichervakuolen in den Kotyledonen der Erbsen sehr gut erforscht ist und hier zudem der Transportweg der Speicherproteine durch deren frühe, schon im cis-Golgi-Bereich stattfindende Aggregation gut verfolgt werden kann, wäre es sinnvoll SNARE-Proteine in der Erbse zu identifizieren und durch Immunogold-Markierungen zu lokalisieren. Dies könnte das Wissen über die ausschließlich bei Pflanzen existierende Sortierung von Proteinen auf zwei alternativen Wegen zu den jeweiligen Vakuolentypen erheblich erweitern und zudem zuverlässige membrangebundene Marker für die einzelnen Vakuolentypen liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmed, S. U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J. E., Matsuoka, K. und Raikhel, N. V. (2000)  
The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH<sub>2</sub>-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*.  
*J. Cell Biol.* **149**, 1335-1344
- Amelunxen, F. und Heinze, U. (1984)  
Zur Entwicklung der Vakuole in Testa-Zellen des Leinsamens.  
*Eur. J. Cell Biol.* **35**, 343-354
- Baiges, I., Schäffner, A. R., Affenzeller, M. J. und Mas, A. (2002)  
Plant aquaporins.  
*Physiologia Plantarum* **115**, 175-182
- Baluška, F., Parker, J. S., Barlow, P.W. (1992)  
Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.).  
*J. Cell Sci.* **103**, 191-200
- Barrieu, F., Chaumont, F. und Chrispeels, M. J. (1998 a)  
High expression of the tonoplast aquaporin ZmTIP1 in epidermal and conducting tissues of maize.  
*Plant Physiol.* **117**, 1153-1163
- Barrieu, F., Marty-Mazars, D., Thomas, D., Chaumont, F., Charbonnier, M. und Marty, F. (1999)  
Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BopTIP26-1 in cauliflower cells.  
*Planta* **209**, 77-86
- Barrieu, F., Thomas, D., Marty-Mazars, D., Charbonnier, M. und Marty, F. (1998 b)  
Tonoplast intrinsic proteins from cauliflower: immunological analysis, cDNA cloning and evidence for expression in meristematic tissues.  
*Planta* **204**, 335-344
- Boller, T. und Kende, H. (1979)  
Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells.  
*Plant Physiol.* **63**, 1123-1132

Bonifacino, J. S. und Glick, B. S. (2004)

The mechanisms of vesicle budding and fusion.

*Cell* **116**, 153-166

Bradford, M. M. (1976)

A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Chaumont, F., Barrieu, F., Herman, E. und Chrispeels, M. J. (1998)

Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation.

*Plant Physiol.* **117**, 1143-1152

Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. und Chrispeels, M. J. (2000)

Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity.

*Plant Physiol.* **122**, 1025-1034

Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M. J. und Jung, R. (2001)

Aquaporins constitutes a large and highly divergent protein family in maize.

*Plant Physiol.* **125**, 1206-1215

Chrispeels, M. J. und Raikhel, N. V. (1991)

Lectins, lectin genes and their roles in plant defense.

*Plant Cell* **3**, 1-19

Chrispeels, M. J., Crawford, N. M. und Schroeder, J. I. (1999)

Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membrane of plant cells.

*Plant Cell* **11**, 661-675

Chrispeels, M. J., Daniels, M. J. und Weig, A. (1997)

Aquaporins and water transport across the tonoplast.

*Adv. Botan. Res.* **25**, 419-432

Chrispeels, M. J., Higgins, T. J. V. und Spencer, D. (1982 a)

Assembly of storage protein oligomers in the endoplasmic reticulum and processing of the polypeptides in the protein bodies of developing pea cotyledons.

*J. Cell Biol.* **93**, 306-313

Chrispeels, M. J., Higgins, T. J. V., Craig, S. und Spencer, D. (1982 b)

Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons.

*J. Cell Biol.* **93**, 5-14

Craig, S. (1986)

Fixation of a vacuole-associated network of channels in protein-storing pea cotyledon cells.

*Protoplasma* **135**, 67-70

Craig, S., Goodchild, D. J. und Hardham, A. R. (1979)

Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons.

I. Qualitative and quantitative changes in parenchyma cell vacuoles.

*Aust. J. Plant Physiol.* **6**, 81-98

Craig, S., Goodchild, D. J. und Miller, C. (1980)

Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons.

II. Threedimensional reconstructions of vacuoles und protein bodies from sereal sections.

*Aust J. Plant Physiol.* **7**, 329-337

Daniels, M. J., Chaumont, F., Mirkov, T. E. und Chrispeels, M. J. (1996)

Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site.

*Plant Cell* **8**, 587-599

Daniels, M. J., Chrispeels, M. J. und Yeager, M. (1999)

Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography.

*J. Mol. Biol.* **294**, 1337-1349

Di Sansebastiano, G.-P., Paris, N., Marc-Martin, S. und Neuhaus, J.-M. (1998)

Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway.

*Plant J.* **15**, 449-457

Di Sansebastiano, G.-P., Paris, N., Marc-Martin, S. und Neuhaus, J.-M. (2001)

Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles.

*Plant Physiol.* **126**, 78-86

- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G., Marivet, J. und Burkard, G. (1996)  
Havey-metal-responsive genes in maize: Identification and comparison of their  
expression upon various forms of abiotic stress.  
*Planta* **199**, 1-8
- Dieckmann, W. (1994)  
Immuncytochemische Visualisierung von Oberflächenrezeptoren in  
Pflanzenzellen unter besonderer Berücksichtigung ihrer Internalisierung durch  
rezeptorvermittelte Endocytose.  
Dissertation, Universität Göttingen
- Drobny, M., Schnolzer, M., Fiedler, S., Lüttge, U., Fischer-Schliebs, E., Christian, A. L.  
und Ratajczak, R. (2002)  
Phenotypic subunit composition of the tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)  
vacuolar-type H(+)-translocating ATPase.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1564**, 243-255
- Eckert, M., Biela, A., Siefritz, F. und Kaldenhoff, R. (1999)  
New aspects of plant aquaporin regulation and specificity.  
*J. Exp. Botany* **50**, 1541-1545
- Engel, A. und Stahlberg, H. (2002)  
Aquaglyceroporins: Channel Proteins with a conserved core, multiple functions,  
and variable surfaces.  
*Int. Rev. of Cyt.* **215**, 75-104
- Engel, A., Fijiyoshi, Y. und Agre, P. (2000)  
The importance of aquaporin water channel protein structures.  
*EMBO J.* **19**, 800-806
- Epimashko, S., Meckel, T., Fischer-Schliebs, E., Lüttge, U. und Thiel, G. (2004)  
Two funktionally different vacuoles for static and dynamic purposes in one plant  
mesophyll leaf cell.  
*Plant J.* **37**, 294-300
- Ferreira, R. B., Freitas, R. L. und Teixeira, A. R. (2003)  
Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage  
vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated.  
*FEBS Letters* **534**, 106-110



- Fleurat-Lessard, P., Fragne, N., Maeshima, M., Ratajczak, R., Bonnemain, J.-L. und Martinoia, E. (1997)  
Increased expression of vacuolar aquaporin and H<sup>+</sup>-ATPase related to motor cell function in *Mimosa pudica* L..  
*Plant Physiol.* **114**, 827-834
- Fortin, M. G., Morrison, N. A. und Verma, D. P. S. (1987)  
Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin, is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment.  
*Nucleic Acids Res.* **17**, 813-824
- Fotiadis, D., Jenö, P., Mini, T., Wirtz, S., Müller, S. A., Frayssé, L., Kjellbom, P. und Engel, A. (2002)  
Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 1707-1714
- Freier, T. und Rüdiger, H. (1987)  
*In vivo* binding partners of the *Lens culinaris* lectin.  
*Biol. Chem. Hoppe Seyler* **368**, 1215-1223
- Gao, Y. P., Young, L., Bonham-Smith, P. und Gusta, L. V. (1999)  
Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions.  
*Plant Mol. Biol.* **40**, 139-144
- Gerbeau, P., Güçlü, J., Ripoche, P. und Maurel, C. (1999)  
Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes.  
*Plant J.* **18**, 577-587
- Gilkey, J. C. und Staehelin, L. A. (1986)  
Advances in ultra-rapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure.  
*J. Elektron Microsc. Tech.* **3**, 177-210
- Golldack, D. und Dietz, K.-J. (2001)  
Salt-induced expression of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific.  
*Plant Physiol.* **125**, 1643-1654

- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y. und Nishimura, M. (1998)  
Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles.  
*Plant Cell* **10**, 825-836
- Heller, K. B., Lin, E. C. C. und Wilson, T. H. (1980)  
Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* **144**, 274-278
- Herman, E. M., Li, X., Su, R. T., Larsen, P., Hsu, H. und Sze, H. (1994)  
Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells.  
*Plant. Physiol.* **106**, 1313-1324
- Heymann, J. B. und Engel A. (1999)  
Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of water channels.  
*News Physiol. Sci.* **14**, 187-193
- Higuchi, T., Suga, S., Tsuchiya, T., Hisada, H., Morishima, S., Okada, Y. und Maeshima, M. (1998)  
Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin.  
*Plant Cell Physiol.* **39**, 905-913
- Hilling, B. und Amelunxen, F. (1985)  
On the development of the vacuole. II. Further evidence for endoplasmic reticulum origin.  
*Eur. J. Cell Biol.* **38**, 195-200
- Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D. G. und Hinz, G. (2001)  
Vacuolar storage proteins are sorted in the *cis*-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus.  
*J. Cell Biol.* **152**, 41-50
- Hinz, G., Hillmer, S., Bäumer, M. und Hohl, I. (1999)  
Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles.  
*Plant Cell* **11**, 1509-1524

- Hoek van, A. N., Hom, M. L., Luthjiens, L.H., de Jong, M. D., Dempster, J. A. und Os van, C. H. (1991)  
Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation.  
*J. of Biol. Chem.* **266**, 16633-16635
- Höfte, H. und Chrispeels, M. J. (1992)  
Protein sorting to the vacuolar membrane.  
*Plant Cell* **4**, 995-1004
- Hoh, B., Hinz, G., Jeong, B.-K. und Robinson, D. G. (1995)  
Protein storage vacuoles form *de novo* during pea cotyledon development.  
*J. Cell Sci.* **108**, 299-310
- Hohl, I., Robinson, D. G., Chrispeels, M. J. und Hinz, G. (1996)  
Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat.  
*J. Cell Sci.* **109**, 2539-2550
- Holwerda, B. C. und Rogers, J. C. (1992)  
Purification and characterization of aleurain: a plant thiol protease functionally homologous to mammalian cathepsin H.  
*Plant Physiol.* **99**, 848-855
- Holwerda, B. C., Galvin, N. J., Baranski, T. J. und Rogers, J. C. (1990)  
*In vitro* processing of aleurain, a barley vacuolar thiol protease.  
*Plant Cell* **2**, 1091-1106
- Imamura, H., Nakano, M., Noji, H., Muneyuki, E., Ohkuma, S., Yoshida, M. und Yokoyama, K. (2003)  
Evidence for rotation of V1-ATPase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2312-2315
- Iwata, M., Imamura, H., Stambouli, E., Ikeda, C., Tamakoshi, M., Nagata, K., Makyio, H., Hankamer, B., Barber, J., Yoshida, M., Yokoyama, K. und Iwata, S. (2004)  
Crystal structure of a central stalk subunit C and reversible association/dissociation of vacuole-type ATPase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 59-64

- Jauh, G.-Y., Fischer, A. M., Grimes, H. D., Ryan, C. A. und Rogers, J. (1998)  
δ-Tonoplast intrinsic protein defines unique plant vacuole functions.  
*Cell Biol.* **95**, 12995-12999
- Jauh, G.-Y., Phillips, T. E. und Rogers, J. C. (1999)  
Tonoplast intrinsic protein isoforms as makers for vacuolar functions.  
*Plant Cell.* **11**, 1867-1882
- Johanson, U. und Gustavsson, S. (2002)  
A new subfamily of major intrinsic proteins in plants.  
*Mol. Biol. Evol.* **19**, 456-461
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayse, L.,  
Weig, A. R. und Kjellbom, P. (2001)  
The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis  
provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in  
plants.  
*Plant Physiol.* **126**, 1358-1369
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. und Kjellbom, P. (2000)  
The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance.  
*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1465**, 324-342
- Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. K., Chrispeels, M. J., Larsson, C. und  
Kjellbom, P. (1998)  
Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated  
by phosphorylation.  
*Plant Cell* **10**, 451-459
- Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. und Kjellbom, P. (1996)  
The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative  
aquaporins and are phosphorylated in response to Ca<sup>2+</sup> and apoplastic water  
potential.  
*Plant Cell* **8**, 1181-1191
- Johnson, K. D. und Chrispeels, M. J. (1992)  
Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein.  
*Plant Physiol.* **100**, 1787-1795
- Johnson, K. D., Herman, E. M. und Chrispeels, M. J. (1989)  
An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds.  
*Plant Physiol.* **91**, 1006-1013

Johnson, K. D., Höfte, H. und Chrispeels, M. J. (1990)

An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF).

*Plant Cell* **2**, 525-532

Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B. und Agre P. (1994 a)

Molekular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model.

*J. of Biol. Chem.* **269**, 14648-14654

Jung, J., Bhat, R. V., Preston, G. M., Guggino, W. B., Baraban, J. M. und Agre, P. (1994 b)

Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain - candidate osmorezeptor and regulator of water balance.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 13052-13056

Kaldenhoff, R., Kölling, A., Meyers, J., Karmann, U., Ruppel, G. und Richter, G. (1995)

The blue light-responsive *AthH2* gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma.

*Plant J.* **7**, 87-95

Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjövall, S., Johnsson, I., Hedfalk, K., Engel, A. und Kijelbom, P. (2003)

Reconstruction of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*.

*FEBS Letters* **537**, 68-72

Kirch, H.-H., Vera-Estrella, R., Goldlack, D., et al. (2000)

Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*.

*Plant Physiol.* **123**, 111-124

Klebl, F., Wolf, M. und Sauer, N. (2003)

A defect in the yeast plasmamembrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.) and by *Arabidopsis thaliana*  $\delta$ -TIP or  $\gamma$ -TIP.

*FEBS Letters* **547**, 69-74

- Knibbs, R., Goldstein, I. J., Ratcliff, R. M. und Shibuya, N. (1991)  
Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leuko-agglutinating lectin from *Maackia amurensis*.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 83-88
- Krajinski, F., Biela, A., Schubert, D., et al. (2000)  
Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaq1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*.  
*Planta* **211**, 85-90
- Kummer, H. und Rüdiger, H. (1988)  
Characterization of a lectin-binding storage protein from pea (*Pisum sativum*).  
*Biol. Chem. Hoppe Seyler* **369**, 639-646
- Laemmli, U. K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685
- Langhans, M., Ratajczak, R., Lützelshwab, M., Michalke, W., Wächter, R., Fischer-Schliebs, E. und Ullrich, C. I. (2001)  
Immunolocalization of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L..  
*Planta* **213**, 11-19
- Leidreiter, K., Kruse, A., Heinecke, D., Robinson, D. G. und Heldt, H.-W. (1995)  
Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) leaves.  
*Bot. Acta* **108**, 439-444
- Lerner, D. R. und Raikhel, N. V. (1989)  
Cloning and characterization of root-specific barley lectin.  
*Plant Physiol.* **91**, 124-129
- Liu, L.-H., Ludewig, U., Gassert, B., Frommer, W. B. und von Wirén, N. (2003)  
Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*.  
*Plant Physiol.* **133**, 1220-1228

- Liu, Q., Umeda, M. und Uchimiya, H. (1994)  
Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein.  
*Plant Mol. Biol.* **26**, 2003-2006
- Lopez, F., Bousser, A., Sissoëff, I., Hoarau, J. und Mahe, A. (2004)  
Characterization in maize of ZmTIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity.  
*J. Exp. Botany* **55**, 539-541
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L. A. und Randell, R. J. (1951)  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E. und Chrispeels, M. J. (1992)  
The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein  $\gamma$ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement.  
*Plant Physiol.* **100**, 1633-1639
- Maeshima, M. (1992)  
Characterization of the major integral protein of vacuolar membrane.  
*Plant Physiol.* **98**, 1248-1254
- Maeshima, M. (2001)  
Tonoplast transporters: Organisation and function.  
*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 469-497
- Maeshima, M. und Yoshida, S. (1989)  
Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 20068-20073
- Maeshima, M., Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y. und Nishimura, M. (1994)  
Accumulation of vacuolar H-pyrophosphatase and H-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds.  
*Plant Physiol.* **98**, 1248-1254
- Mahendrasingam, S., Wallam, C. A. und Hackney, C. M. (2004)  
Two approaches to double post-embedding immunogold labeling of freeze-substituted tissue embedded in low temperature Lowicryl HM20 resin.  
*Brain Res. Prot.* **11**, 134-141

Marty, F. (1978)

Cytochemical studies on GERL, provacuoles and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 852-856

Marty, F. (1997)

The biogenesis of vacuoles: Insights from microscopy.

*Adv. Botan. Res.* **25**, 1-42

Marty, F. (1999)

Plant vacuoles.

*Plant Cell* **11**, 587-599

Marty-Mazars, D., Clemencet, M. C., Dozolme, P. und Marty, F. (1995)

Antibodies to the tonoplast from the storage parenchyma cells of beetroot recognize a major intrinsic protein related to TIPs.

*Eur. J. Cell Biol.* **66**, 106-118

Matsuura-Endo, C., Maeshima, M. und Yoshida, S. (1990)

Subunit composition of vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase from mung bean.

*Eur. J. Biochem.* **187**, 745-751

Maurel, C. (1997)

Aquaporins and water permeability of plant membranes.

*Annu. Rev. Plant Physiol.* **48**, 399-429

Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V. und Heyes, J. (2002)

Molecular physiology of aquaporins in plants.

*Int. Rev. of Cyt.* **215**, 105-148

Maurel, C., Kado, R. T., Guern, J. und Chrispeels, M. J. (1995)

Phosphorylation regulates the water channel activity of seed-specific aquaporin  $\alpha$ -TIP.

*EMBO J.* **14**, 3028-3035

Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J. I. und Chrispeels, M. J. (1993)

The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates specific channels in *Xenopus* oocytes.

*EMBO J.* **12**, 2241-2247



Meyberg, M. (1988)

Selective staining of fungal hyphae in parasitic and symbiotic plant-fungus associations.

*Histochemistry* **88**, 197-199

Miao, G.-H., Hong, Z. und Verma, D. P. S. (1992)

Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane.

*J. Cell Biol.* **118**, 481-490

Mitsuoka, K., Murata, K., Walz, T., Hirai, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. und Fujiyoshi, Y. (1999)

The structure of aquaporin-1 at 4.5-Å resolution reveals short  $\alpha$ -helices in the center of the monomer.

*J. Struct. Biol.* **128**, 34-43

Müntz, K. (1998)

Deposition of storage proteins.

*Plant Mol. Biol.* **38**, 77-99

Muramatsu, S. und Mizuno, T. (1989)

Nucleotide sequence of the region encompassing the *glpKF* operon and its upstream region containing a bent DANN sequence of *Escherichia coli*.

*Nucl. Acids Res.* **17**, 4378

Murdock, L. L., Huesing, J. E., Nielsen, S. S., Pratt, R. C. und Shade, R. E. (1990)

Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil.

*Phytochemistry* **29**, 85-89

Nishi, T. und Forgac, M. (2002)

The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps.

*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103

Oberbeck, K., Drucker, M. und Robinson D. G. (1994)

V-type ATPase and pyrophosphatase in endomembranes of maize roots.

*J. Exp. Bot.* **45**, 235-244

Olbrich, A (2000)

Immunocytochemische Charakterisierung der Vakuolen in Gerstenwurzelzellen.

Diplomarbeit, Universität Göttingen

Palade, G. E. (1952)

A study of fixation for electron microscopy.

*J. Exp. Med.* **95**, 285-297

Paris, N. und Neuhaus, J.-M. (2002)

BP-80 as a vacuolar sorting receptor.

*Plant Mol. Biol.* **50**, 903-914

Paris, N., Rogers, S. W., Jiang, L., Kirsch, T., Beevers, L., Phillips, E. und Rogers, J. C. (1997)

Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor.

*Plant Physiol.* **115**, 29-39

Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L. und Rogers, J. C. (1996)

Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments.

*Cell* **85**, 563-572

Peumans, W. J. und Damme van, E. J. M. (1995)

Lectins as plant defense proteins.

*Plant Physiol.* **109**, 347-352

Phillips, A. L. und Huttler, A. K. (1994)

Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: Expression of the tonoplast water channel,  $\gamma$ -TIP, is increased by GA<sub>3</sub>.

*Plant Mol. Biol.* **24**, 603-615

Rapoport, T. A., Jungnickel B. und Kutay, U. (1996)

Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes.

*Annu. Rev. Biochem.* **65**, 271-303

Rauh, W. (1950)

Morphologie der Nutzpflanzen.

Quelle und Meyer, Heidelberg (2. Auflage)

Reizer, J., Reizer, A. und Saier, M. H. (1993)

The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathways of the evolution and proposed functional differentiation of the two repeated halves of proteins.

*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 235-257

- Robinson, D. G. und Hinz, G. (1997)  
Vacuole biogenesis and protein transport to the plant vacuole: a comparison with the yeast vacuole and the mammalian lysosome.  
*Protoplasma* **197**, 1-25
- Robinson, D. G. und Hinz, G. (1999)  
Golgi-mediated transport of seed storage proteins.  
*Seed Sci. Res.* **9**, 267-283
- Robinson, D. G., Hinz, G. und Holstein, S. E. H. (1998)  
The molecular characterization of transport vesicles.  
*Plant Mol. Biol.* **38**, 49-76
- Robinson, D. G., Hoh, B., Hinz, G. und Jeong, B.-K. (1995)  
One vacuole or two vacuoles: do protein storage vacuoles arise *de novo* during pea cotyledon development?  
*Plant Physiol.* **145**, 654-664
- Robinson, D. G., Rogers, J. C. und Hinz, G. (2000)  
Post golgi, prevacuolar compartments.  
*Annual Plant Reviews* **5**, 271-298
- Rojo, E., Gillmor, C. S., Kovaleva, V., Somerville, C. R. und Raikhel, N. V. (2001)  
VACUOLELESS1 is an essential gene required for vacuole formation and morphogenesis in Arabidopsis.  
*Dev. Cell.* **1**, 303-310
- Rossato, L., Le Dantec, C., Laine, P. und Ourry, A. (2002)  
Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: identification, characterization and immunolocalization of a putative taproot storage glycoprotein.  
*J. Exp. Botany* **53**, 265-275
- Saito C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M. und Nakano, A. (2002)  
A complex and mobile structure forms a distinct subregions within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of Arabidopsis.  
*Plant J.* **29**, 245-255

Salinovic, O. und Montelaro, R. C. (1986)

Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis.

*Anal. Biochem.* **156**, 341-347

Sandal, N. N. und Marcker, K. A. (1988)

Soybean nodulin 26 is homologous to major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane.

*Nucleic Acids Res.* **16**, 9347

Sarda, X., Tousch, D., Ferrare, K., Cellier, F., Alcon, C., Dupuis, J. M., Casse, F. und Lamaze, T. (1999)

Characterization of closely related  $\delta$ -TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air.

*Plant Mol. Biol.* **40**, 179-191

Sarda, X., Tousch, D., Ferrare, K., Legrand, E., Dupuis, J. M., Casse-Delbart, F. und Lamaze, T. (1997)

Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells.

*Plant J.* **12**, 1103-1111

Sato, M. H., Nakamura, N., Ohsumi, Y., Kouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M. und Wada, Y. (1997)

The AtVAM3 encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana*.

*J. Biol. Chem.* **272**, 24530-24535

Schlumberg, A., Mauch, F., Vögeli, U. und Boller, T. (1986)

Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth.

*Nature* **324**, 365-367

Schünmann, P. H. D. und Ougham, H. J. (1996)

Identification of three cDNA clones expressed in the leaf extension zone and with altered patterns of expression in the slender mutant of barley: a tonoplast intrinsic protein, a putative structural protein and protochlorophyllide oxidoreductase.

*Plant Mol. Biol.* **31**, 529-537

- Serraj, R., Frangne, N., Maeshima, M., Fleurat-Lessard, P. und Drevon, J. J. (1998)  
A  $\gamma$ -TIP cross-reacting protein is abundant in the cortex of soybean N<sub>2</sub>-fixating nodules.  
*Planta* **206**, 681-684
- Shi, L. B., Skach, W. R. und Verkman, A. S. (1994)  
Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild type-mutant heterodimers.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 10417-10422
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. und Peumans W. J. (1987)  
The elderberry (*Sambucus nigra*) bark lectin recognizes the Neu5Ac ( $\alpha$ 2-6) Gal/GalNac-sequence.  
*J. Biol. Chem.* **262**, 1596-1601
- Spurr, A. R. (1969)  
A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.  
*Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43
- Staswick, P. E. (1994)  
Storage proteins of vegetativ plant tissues.  
*Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* **45**, 303-322
- Suga, S. und Maeshima, M. (2004)  
Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis.  
*Plant Cell Physiol.* **45**, 823-830
- Suga, S., Komatsu, S. und Maeshima, M. (2002)  
Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormoner in radish seedlings.  
*Plant Cell Physiol.* **43**, 1229-1237
- Surpin, M. und Raikhel, N (2004)  
Traffic jams affect plant development and signal transduction.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 100-109
- Swanson, S. J., Bethke, P. C. und Jones, R. L. (1998)  
Barley aleurone cells contain two types of vacuoles. Characterization of lytic organelles by use of fluorescent probes.  
*Plant Cell* **10**, 685-698

- Sze, H., Li, X. und Palmgren, M. G. (1999)  
Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-Pumping ATPases: Regulation and biosynthesis.  
*Plant Cell* **11**, 677-689
- Thiele, C., Gerdes, H. H. und Hutter, W. B. (1997)  
Protein secretion: puzzling receptors.  
*Curr Biol.* **7**, 496-500
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4354
- Tse, Y. C., Mo, B., Hillmer, S., Zhao, M., Lo, S. W., Robinson, D. G. und Jiang, L. (2004)  
Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells.  
*Plant Cell* **16**, 672-693
- Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E. und Smith, J. A. C. (1999)  
Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations.  
*J. Exp. Bot.* **50**, 1055-1071
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M. und Bramley, H. (2002)  
Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles.  
*Plant Cell Environment* **25**, 173-194
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F. und Kaldenhoff, R. (2003)  
The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions.  
*Nature* **425**, 734-737
- Uemura, T., Yoshimura, S. H., Takeyasu, K. und Sato, M. H. (2002)  
Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein.  
*Genes to Cells* **7**, 743-753

- Verbavatz, J. M., Brown, D., Sabolic, I., Valenti, G., Ausiello, D. A., Hoek van, A. N., Ma, T. und Verkman, A. S. (1993)  
Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study.  
*J. Cell Biol.* **123**, 605-618
- Weig, A., Deswarte, C. und Chrispeels, M. J. (1997)  
The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group.  
*Plant Physiol.* **114**, 1347-1357
- Wenzel, M., Gers-Barlag, H., Schimpl, A. und Rüdiger, H. (1993)  
Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds.  
*Biol. Chem. Hoppe Seyler* **374**, 887-894
- Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984)  
A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.  
*Analyt. Biochem.* **138**, 141-143
- Wilkins, T. A. und Tiwara, S. C. (1995)  
Biogenesis of distinct vacuole-types during cell differentiation of seed trichomes.  
*J. Cell. Biochem. Suppl.* **19A**, 155
- Wink, M. (1993)  
The plant vacuole: A multifunctional compartment.  
*J. Exp. Bot.* **44** (Suppl.), 231-246
- Yang, S., Maeshima, M., Tanaka, Y. und Komatsu, S. (2003)  
Modulation of vacuolar H<sup>+</sup>-Pumps and aquaporin by phytohormones in rice seedling leaf sheaths.  
*Biol. Pharm. Bull.* **26**, 88-92
- Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M. und Tamakoshi, M. (2003)  
Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase.  
*J. Biol. Chem.* **278**, 24255-24258
- Yoshida, M., Muneyuki, E. und Hisabori, T. (2001)  
ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell.  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669-677

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie des Heidelberger Instituts für Pflanzenwissenschaften angefertigt. Herrn Prof. Dr. David G. Robinson möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und das Interesse am Fortgang der Arbeit und meiner weiteren beruflichen Laufbahn danken. Ebenso möchte ich ihm dafür danken, dass er mir, im Rahmen meiner Arbeit, den Auslandsaufenthalt im Labor von Prof. John C. Rogers in Pullman (USA) ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Thomas Rausch danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Stefan Hillmer möchte ich meinen Dank aussprechen für die immer gewährte Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge beim Verfassen der Dissertation. Dieser Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Peter Oliviusson, dem ich zusätzlich für die maßgebliche Unterstützung bei der geplanten Publikation der Daten danken möchte.

Prof. John C. und Sally Rogers möchte ich für ihre Gastfreundschaft und die gute Betreuung während meines Aufenthaltes in ihrem Labor danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Frau Dr. Meike Barth, der ich ebenfalls für die schöne Zeit neben der Arbeit danken möchte. Herrn Dr. Ali Movafeghi und Herrn Priv. Doz. Dr. Giselbert Hinz möchte ich für ihre praktischen Ratschläge und ihre konstruktive Kritik danken.

Frau Petra Steffen und Herrn Hans Herrmann danke ich für die Korrektur meiner Arbeit. Herrn Andreas Herrmann und meiner ganzen Familie danke ich herzlich für ihre vielfältige Unterstützung.

Die Arbeit wurde u. a. ermöglicht durch den Erhalt eines Stipendiums der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.